

**Identifizierung, Klonierung und biochemische  
Charakterisierung der Sulfitoxidase aus  
*Arabidopsis thaliana***

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte  
Dissertation**

**von Thomas Eilers  
aus Braunschweig**

**1. Referent:** Prof. Dr. R.R. Mendel  
**2. Referent:** Prof. Dr. M. Wetter  
**eingereicht am:** 12. Juli 2001  
**mündliche Prüfung am:** 12. September 2001

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Eilers, T., Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T., Nieder, J., Koch, B., Hille, R., Hänsch, R., Mendel, R.R.: Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase: A new player in plant sulfur metabolism in Vorbereitung

Schwarz, G., Schulze, J., Bittner, F., Eilers, T., Kuper, J., Bollmann, G., Nerlich, A., Brinkmann, H., Mendel, R.R.: The Molybdenum Cofactor Biosynthetic Protein Cnx1 Complements Molybdate-Repairable Mutants, Transfers Molybdenum to the Metal Binding Pterin, and Is Associated with the Cytoskeleton *Plant Cell* **12**: 2455-2472 (2000)

## **Tagungsbeiträge**

Eilers, T., Brinkmann, H., Nieder, J., Matthies, A., Koch, B., Schwarz, G., Hille, R., Mendel, R.R.: Plant sulfite oxidase: cloning and biochemical characterization, Gordon Research Conference: Molybdenum and Tungsten enzymes, Queen's College Oxford, UK (1-6 July 2001)

Mendel, R.R., Bittner, F., Eilers, T., Gutzke, G., Hänsch, R., Hoffmann, C., Kuper, J., Schulze, J., Schwarz, G.: The molybdenum cofactor is essential for ABA-biosynthesis, stress response and N-assimilation - analysis of 7 novel genes and their products 14. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Germany (28.2. - 3.3.01)

Eilers, T., Hoffmann, C., Richter, T., Nieder, J., Brinkmann, H., Schwarz, G., Hänsch, R., Mendel, R. R.: The missing link in S-metabolism: Sulfite Oxidase in Plants. Abs # 562. The American Society of Plant Physiologists, "Serving the Plant Science Community Since 1924." San Diego, USA (15-19 July 2000)

Eilers, T., Richter, T., Hoffmann, C., Schwarz, G., Mendel, R.R.: Sulfite oxidase: A novel Mo-enzyme in plants. SFB Congress: Metal Mediated Reactions Modelled After Nature, Jena, Germany (12-16 September 1999)

Schwarz, G., Eilers, T., Brinkmann, H., Hecht, H.-J., Boxer, D.H. & Mendel, R.R.: The plant molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 binds molybdopterin to its two domains with high affinities. Biochemical Society Meeting, Xanthine oxidase: enzymology and pathology, Univ. Bath, UK (1997)

Schwarz, G., Eilers, T., Mendel, R.R.: The plant protein Cnx1 is involved in the last Stepp of molybdenum cofactor biosynthesis by binding molybdopterin with high affinity. Nitrogen Assimilation: Molecular and Genetic Aspects. Univ. South Florida, Tampa FL, USA (1997)

Mendel, R.R., Bittner, F., Bollmann, G., Brinkmann, H., Eilers, T., Greger, K., Nerlich, A., Nieder, J., Riedel, B., Schledzewski, K., Schulze, J., Schwarz, G. & Stallmeyer, B.: Molybdenum cofactor biosynthesis in higher plants. Nitrogen Assimilation: Molecular and Genetic Aspects. Univ. South Florida, Tampa FL, USA (1997)

Prof. Dr. Ralf-R. Mendel  
Braunschweig, den 12.07.01

Thomas Eilers

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Spurenelement Molybdän im biologischen System	1
1.2 Der Molybdäncofaktor	3
1.3 Molybdoenzyme	8
1.4 Sulfitoxidase	11
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>13</b>
2.1 Identifikation und Charakterisierung eines pflanzlichen Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Homologien zu der Sulfitoxidase aus <i>Gallus gallus</i>	13
2.1.1 Analyse der At-sox-cDNA	14
2.1.2 Analyse der genomischen Sequenz der At-sox	16
2.1.3 Sequenzalignment der At-SOX im Vergleich mit anderen SOXs	20
2.1.4 Datenbankanalyse zur Identifizierung von putativen posttranslationalen Modifikationsstellen und funktionellen Sequenzmotiven	22
2.2 Klonierung der At-sox und chromatographische Reinigung des rekombinant exprimierten SOX-Proteins (rAt-SOX)	25
2.2.1 Klonierung verschiedener At-sox-Expressionskonstrukte	25
2.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung der rAt-SOX	27
2.2.2.1 Optimierung der Expressionsrate der rAt-SOX	27
2.2.2.2 Modifikationen der Zellyse-Bedingungen	31
2.2.2.3 Affinitätschromatographische Reinigung der rAt-SOX an Ni-NTA	32
2.3 Klonierung einer SOX aus <i>Mus musculus</i> und chromatographische Reinigung des rekombinant exprimierten SOX-Proteins (rMm-SOX)	35

---

2.4	Erzeugung und Charakterisierung von Punktmutanten der rAt-SOX	37
2.4.1	Erzeugung von mutagenisierten rAt-SOX-Proteinen	38
2.4.2	Expression und Reinigung von punktmutierten At-SOX-Proteinen	38
2.4.3	Funktionelle Charakterisierung der mutierten rAt-SOX-Proteine: Bestimmung des MPT-Gehaltes und der SOX-Aktivität	39
2.5	Charakterisierung von <i>N. plumbaginifolia cnx</i> -Mutanten bezüglich ihrer SOX-Expression und SOX-Aktivität	41
2.5.1	Expressionsanalyse der SOX in <i>N. plumbaginifolia cnx</i> -Mutanten	42
2.5.2	Rekonstitution der SOX-Aktivität bei <i>N. plumbaginifolia cnx</i> -Mutanten	43
2.6	Reinigung der nativen SOX aus <i>Nicotiana tabacum</i> (Nt-SOX)	45
2.6.1	Anreicherung der Nt-SOX mittels Anionenaustauscher-Chromatographie	45
2.6.2	Anreicherung der Nt-SOX mittels Gelfiltration	47
2.6.3	Abtrennung von Verunreinigungen der Nt-SOX mittels Anionenaustauscher- Chromatographie	48
2.6.4	N-terminale Sequenzierung der gereinigten Nt-SOX	50
2.7	Vergleichende biochemische Charakterisierung der rekombinant exprimierten At-SOX und der nativen Nt-SOX	51
2.7.1	Bestimmung der apparenten molekularen Masse der rAt-SOX	51
2.7.2	Identifizierung und Charakterisierung des Molybdäncofaktors der rAt-SOX mittels HPLC-Analyse und <i>nit-1</i> -Assay	53
2.7.2.1	Charakterisierung des Molybdäncofaktors aus rAt-SOX	53
2.7.2.2	Rekonstitution der <i>nit-1</i> -Aktivität durch den Molybdäncofaktor aus rAt-SOX	55
2.7.3	Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) der rAt-SOX	56
2.8	Enzymologische Charakterisierung der rekombinant-exprimierten At-SOX und Mm-SOX sowie der nativ-gereinigten Nt-SOX	57
2.8.1	Spektroskopische Analyse der rAt-SOX	57
2.8.1.1	UV/vis-Spektroskopie	58
2.8.1.2	EPR-spektroskopische Analyse des Mo-Zentrums	60
2.8.2	Enzymkinetische Eigenschaften der rAt-SOX, rMm-SOX und Nt-SOX	62

---

2.8.2.1	Katalytische Eigenschaften der rAt-SOX, rMm-SOX und Nt-SOX	66
2.8.2.2	Inhibitionsstudien der rAt-SOX	69
2.9	Lokalisation der pflanzlichen SOX	71
2.10	Biochemische Identifikation möglicher Interaktionspartner der At-SOX	74
2.10.1	Einsatz des pflanzlichen Gens <i>At-sox</i> im Two-Hybrid-Screen einer <i>A. thaliana</i> cDNA-Bank	74
2.10.2	Immuno-Affinitätschromatographie der rAt-SOX	78
3.	<b>Diskussion</b>	80
3.1	Identifikation und Charakterisierung eines Gens für eine pflanzliche Sulfitoxidase ( <i>At-sox</i> )	80
3.2	Biochemische Eigenschaften des in <i>E. coli</i> rekombinant-exprimierten At-SOX-Proteins	83
3.2.1	Expression und chromatographische Reinigung	83
3.2.2	Bestimmung der apparenten molekularen Masse	85
3.3	Native Reinigung der Sulfitoxidase aus <i>N. tabacum</i> (Nt-SOX)	86
3.4	Enzymologische und spektroskopische Charakterisierung der pflanzlichen Sulfitoxidasen rAt-SOX und Nt-SOX	88
3.5	Lokalisation der pflanzlichen SOX	92
3.6	Mögliche Interaktionspartner der pflanzlichen SOX	95
3.7	Die Funktion der pflanzlichen SOX	97

---

<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>105</b>
4.1	Materialien	105
4.1.1	Verwendete Chemikalien, Enzyme und eingesetzte Geräte	105
4.1.2	Verwendete Organismen-Stämme	106
4.1.3	Anzuchtbedingungen der Pflanzen	106
4.1.4	Verwendete Plasmide	107
4.1.5	Verwendete Oligonukleotide	108
4.1.6	Antikörper	109
4.2	Methoden	109
4.2.1	Molekularbiologische Arbeiten	109
4.2.1.1	Klonierung	109
4.2.1.2	DNA-Isolation	110
4.2.1.3	PCR-Amplifikation	110
4.2.1.4	DNA-Sequenzierung	110
4.2.2	Proteinbiochemische Standardmethoden	111
4.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	111
4.2.2.2	Proteinfärbung	111
4.2.2.3	Immunoblot Analyse	112
4.2.2.4	Dialyse	113
4.2.2.5	Gelfiltration	113
4.2.2.6	Proteinkonzentration	114
4.2.2.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	114
4.2.2.8	Proteinsequenzierung	115
4.2.2.9	Färbung von Häm-Domänen im SDS-Polyacrylamidgel	115
4.2.3	Spektroskopische Arbeiten	116
4.2.3.1	UV/vis-Spektroskopie	116
4.2.3.2	EPR-Spektroskopie	116



---

4.2.4	Messungen der SOX-Enzymaktivitäten	117
4.2.4.1	Bestimmung der SOX-Enzymaktivität mit Ferricyanid	117
4.2.4.2	Bestimmung der SOX-Enzymaktivität mit Cytochrom c	118
4.2.4.3	Bestimmung der SOX-Enzymaktivität mit Ferricenium-hexafluorophosphat	118
4.2.5	Überexpression und affinitätschromatographische Reinigung Histidin-markierter Proteine an Ni-NTA-Matrices	118
4.2.5.1	Kulturbedingungen der Überexpression	119
4.2.5.2	Bakterienzelllyse	120
4.2.5.3	Affinitätschromatographische Reinigung an Ni-NTA-Matrix	121
4.2.6	Reinigung der pflanzlichen Sulfitoxidase aus <i>Nicotiana tabacum</i> (Nt-SOX)	122
4.2.6.1	Extraktion des Enzyms aus pflanzlichem Gewebe	122
4.2.6.2	Anionenaustausch-Chromatographie	122
4.2.6.3	Gelfiltration	123
4.2.6.4	Anionenaustausch-Chromatographie	123
4.2.7	Komplementation der <i>Neurospora crassa</i> Mutante <i>nit-1</i> durch MPT	124
4.2.7.1	Anzucht und Präparation des <i>nit-1</i> Extraktes	125
4.2.8	MPT- und Dinukleotid-MPT-Nachweis	125
4.2.8.1	Oxidation und Dephosphorylierung von MPT bzw. MPT-Dinukleotid in einer Proteinlösung	126
4.2.8.2	QAE-Anionenaustausch-Chromatographie	126
4.2.8.3	HPLC-Analyse	127
4.2.9	Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen	128
4.2.9.1	Two-Hybrid-System in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	128
4.2.9.3	Immuno-Affinitätschromatographie (Affi-Gel® 10, BioRad)	130
5.	<b>Literatur</b>	131

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
<i>bla</i>	Ampicillin-Resistenzgen
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	cirka
cDNA	complementary DNA
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
DNase	Desoxynuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GBF	Gesellschaft für biotechnologische Forschung
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
<i>lacI</i>	Lactoserepressor-Gen
m, cm, mm, µm, nm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
Moco	Molybdänkofaktor
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Stickstoff
<i>neo</i>	Kanamycin-Resistenzgen
nm	Nanometer
NR	Nitratreduktase
NPT	Neomycinphosphotransferase
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
ori	origin of replication
PA-Gel	Polyacrylamidgel
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UE	Untereinheit
ÜN	Übernachtskultur
UTB	untranslatierter Bereich
V, mV	Volt, Millivolt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-β-D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

## Abkürzungen für Artnamen

<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
<i>H. vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

## Zusammenfassung

Der Molybdäncofaktor (Moco) ist essentieller Bestandteil aller eukaryotischer Molybdoenzyme, die eine Vielzahl diverser Redoxreaktionen katalysieren und so an zahlreichen unterschiedlichsten Stoffwechselwegen involviert sind. Seine universelle Struktur in Pro- und Eukaryoten, die auf dem namensgebenden Molybdopterin als Pterin-Derivat basiert, läßt einen ähnlichen Syntheseweg in allen Organismen vermuten. In Pflanzen konnten die Molybdoenzyme: Nitratreduktase, Aldehydoxidase und Xanthindehydrogenase/oxidase beschrieben werden.

Im Vordergrund dieser Arbeit standen die Identifikation, Klonierung und biochemische Charakterisierung einer zur tierischen Sulfitoxidase (SOX) homologen Proteinsequenz, die als eine erste putative pflanzliche SOX aus *A. thaliana* galt. Die Ableitung der Proteinsequenz zeigte, dass es sich bei diesem neuen pflanzlichen Molybdoenzym, um das erste eukaryotische Molybdoenzym handelte, welches außer dem Moco kein weiteres aktives Redoxzentrum besaß.

Den molekularen Analysen der kodierenden cDNA und des genomischen Bereiches folgte nach Klonierung und Überexpression im prokaryotischen Expressionssystem die biochemische Charakterisierung der rAt-SOX. Die Enzymanalysen wurden auf verschiedenen Ebenen durchgeführt. Die spektroskopischen Untersuchungen durch die UV/vis- und EPR-Spektroskopie bestätigten das bereits durch die molekularen Analysen nachgewiesene Fehlen einer Häm-Domäne im Vergleich zu den gut charakterisierten tierischen Sulfitoxidasen. Zusätzlich konnte eine andere Lokalisation der At-SOX im Gegensatz zu den tierischen Sulfitoxidasen in Peroxisomen gezeigt werden. Hierfür wurden polyklonale Antikörper gegen die rekombinante At-SOX generiert und für immunologische Analysen eingesetzt. Es zeigte sich eine große Verbreitung im gesamten Pflanzenreich, die von Monokotylen zu Dikotylen und von krautigen zu holzigen Vertretern reichte. Während die enzymkinetischen Messungen ein im gleichen Bereich liegenden Substratumsatz zeigten, konnte durch die EPR-Spektroskopie eine deutlich divergente Natur des aktiven Zentrums nachgewiesen werden. Die erste native Reinigung einer SOX aus *N. tabacum* bekräftigte die ermittelten Resultate.

Die Verwendung der At-SOX als Zielprotein im Two-Hybrid-System erbrachte die Identifikation eines putativen Interaktionspartners, der als Sulfattransporter für den Abtransport des Reaktionsproduktes fungieren könnte. Weiterhin konnte durch Affinitätschromatographie erste Hinweise auf ein putatives Elektronenakzeptor-Protein erbracht werden.

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Spurenelement Molybdän im biologischen System

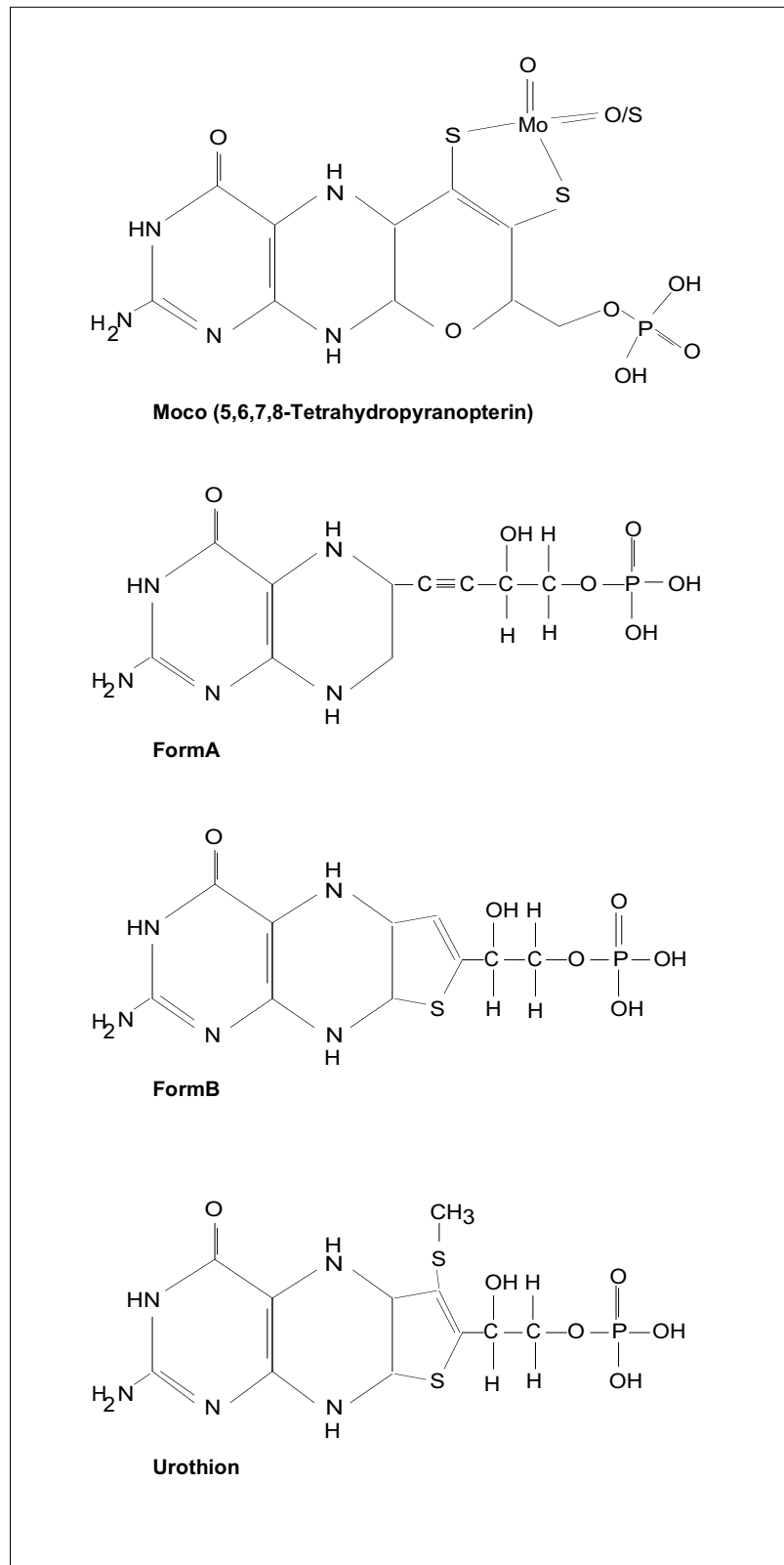
In der Gruppe der Übergangsmetalle spielen die Elemente Ni, Mn, Cu oder Zn als Metallkomponenten von Cofaktoren diverser Redoxenzyme im Stoffwechsel biologischer Systeme eine besondere Rolle. Dabei nehmen die häufig an Elektronentransportprozessen beteiligten Enzyme wichtige Stellungen in der Physiologie der Organismen ein. Als einzigem biologisch aktiven Metall der 6. Gruppe des Periodensystems kommt dem Molybdän (Mo) eine physiologische Bedeutung zuteil. Die Bereitstellung des Metalls für biologische Systeme wird durch die hohe Löslichkeit des Oxidations in Wasser ( $10^{-7} \text{ Mol/dm}^{-3}$ ) gewährleistet (Da Silva & Williams, 1991). Der wachstumsfördernde Einfluß von Molybdän auf das stickstofffixierende Bodenbakterium *Azotobacter chroococcus* wurde erstmals von Bortels (1930) erkannt. Für höhere Organismen konnte die Bedeutung von Molybdän zunächst durch die ausreichende Supplementierung innerhalb der Nahrungskette nicht erkannt werden. Vor mehr als 50 Jahren gab es erste Hinweise auf Mo-Defizienz bei der Beschreibung von Mangel-Symptomen bei Feldpflanzen (zusammengefaßt durch Gupta, 1997). In den selben Jahren beschrieben Westerfeld & Richert (1949) einen XO-Faktor, der als Molybdatsalz für den Erhalt der Enzymaktivität der Xanthinoxidase in der Rattenleber und im Rattenmagen essentiell war (De Renzo *et al.*, 1953). Dies deutete auf eine direkte Assoziation des Molybdats mit einem Enzym und einer Flavinkomponente hin. Die folgenden Identifikationen einer Nitratreduktase aus *Neurospora crassa* (Nicholas & Nason, 1954) und einer tierischen Aldehydoxidase (Mahler *et al.*, 1954), sowie die Analyse der Mo-Abhängigkeit der Sulfitoxidase-Aktivität in der Leber bestätigten die Metall-Enzym-Interaktion. Die Studien von Pateman *et al.*, (1964) an einer Reihe von pleiotropen Mutanten des filamentösen Ascomyceten *A. nidulans* sollten weiteres Licht in die Natur dieser Interaktion bringen. Durch

den gleichzeitigen Verlust der Xanthindehydrogenase- und der Nitratreduktase-Aktivität in diesen Mutanten wurde auf die gemeinsame Nutzung eines identischen Mo-assozierten Kofaktors beider Enzyme geschlossen. In der Bezeichnung der für die Synthese des Molybdänkofaktors (Moco) verantwortlichen Genloci spiegelt sich dieser Zusammenhang wider (cnx für „cofactor for **n**itrate reductase and **x**anthine dehydrogenase“).

In der Folge konnten Nason und Mitarbeiter (1970) bei einer Mischung von zellfreien Extrakten zweier dieser Mutanten *nit-3* (NR-Locus, Coddington, 1976) und *nit-1* eine Rekonstitution der Nitratreduktase-Aktivität beschreiben. Ketchum *et al.*, (1970) und Nason *et al.*, (1974) zeigten, dass diese Restoration des in der *nit-1*-Mutante befindlichen inaktiven NR-Apoproteins auch durch Zugabe einer niedermolekularen Fraktion von denaturierten Präparationen von Molybdoenzymen (z.B. Xanthinoxidase, Aldehydoxidase, Sulfitoxidase) tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Ursprungs durchgeführt werden konnte. Aus diesen wichtigen Beobachtungen konnte auf einen universellen, dissoziierbaren Anteil innerhalb der Molybdoenzyme geschlußfolgert werden. Sein Vorkommen ist ubiquitär in allen Organismenreichen. Eine Ausnahme bildet hierbei lediglich die ebenfalls als Molybdoenzym bekannte bakterielle Nitrogenase, die als einziges Mo-abhängiges Enzym die *nit-1* Mutante aus *N. crassa* nicht komplementieren kann (Pienkos *et al.*, 1997). Ursächlich verantwortlich ist die abweichende Struktur des Nitrogenase-Kofaktors, der als Fe-Moco das Molybdat über Eisen-Schwefel-Cluster und Homocitrat (Ludden *et al.*, 1993) mit einer Stöchiometrie von  $\text{Fe}_7\text{MoS}_9$  komplexiert.

## 1.2 Der Molybdänkofaktor

Aufgrund seiner Sauerstoffempfindlichkeit war die Isolation des Molybdänkofaktors (Moco) lange Zeit nicht möglich. Durch die bedeutsamen Arbeiten von Rajagopalan und Mitarbeiter konnten erste wichtige Hinweise zur Strukturaufklärung des Kofaktors erbracht werden. Johnson *et al.*, (1980) führte eine Spektralanalyse von fluoreszierenden stabilen Oxidationsprodukten des Moco durch. Diese Arbeiten mündeten in den ersten Vorschlag für die Struktur des Molybdänkofaktors (Johnson & Rajagopalan, 1982): die organische Komponente wurde als neuartiges Pterin (Molybdopterin) mit einer 4 C-Atome umfassenden 6-Alkyl-Seitenkette beschrieben, die durch eine Dithiolen-Gruppe am C1' und C2' die Molybdän-Koordination vermittelt und einen terminalen Phosphatester enthält (Abb.1.1). Die zunehmende Anzahl isolierter Molybdoenzyme erbrachte durch die fortschreitende Aufklärung ihrer Kristallstruktur endgültige Belege für die strukturelle Zusammensetzung des Molybdänkofaktors (Romao *et al.*, 1995; Schindelin *et al.*, 1996; Boyington *et al.*, 1997). So zeigte die erste Kristallstruktur-Aufklärung eines bakteriellen Molybdoenzymes eine trizyklische Struktur des Kofaktors, wobei das Sauerstoffatom der Seitenkette unter Ausbildung eines Pyranorings an das bestehende bizyklische Ringsystem bindet. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass diese Struktur nur nach Integration des Moco in das Apoprotein entsteht. Doyle *et al.* (1996) schlug, nach Studien einer Moco-Bindungsdomänen-Mutante, ein Modell für diese Konversion nach partieller Oxidation zu 7,8 Dihydro-MPT vor.



**Abb. 1.1: Struktur und Oxidationsprodukte des Molybdänkofaktors.** Die bizyklische Form des Moco als 5,6,7,8-Tetrahydromolybdopterin wurde von Kramer *et al.*, (1987) postuliert. Als Oxidationsprodukte sind FormA, FormB (Johnson *et al.*, 1984) und Urothion (Gato *et al.*, 1969) angegeben.

Erste metabolische Zusammenhänge konnten durch die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Form B und Urothion aus dem menschlichen Urin festgestellt werden (Gato *et al.*, 1969). Desweiteren weisen sich humane Moco-Patienten durch das Fehlen von Urothion im Urin aus.

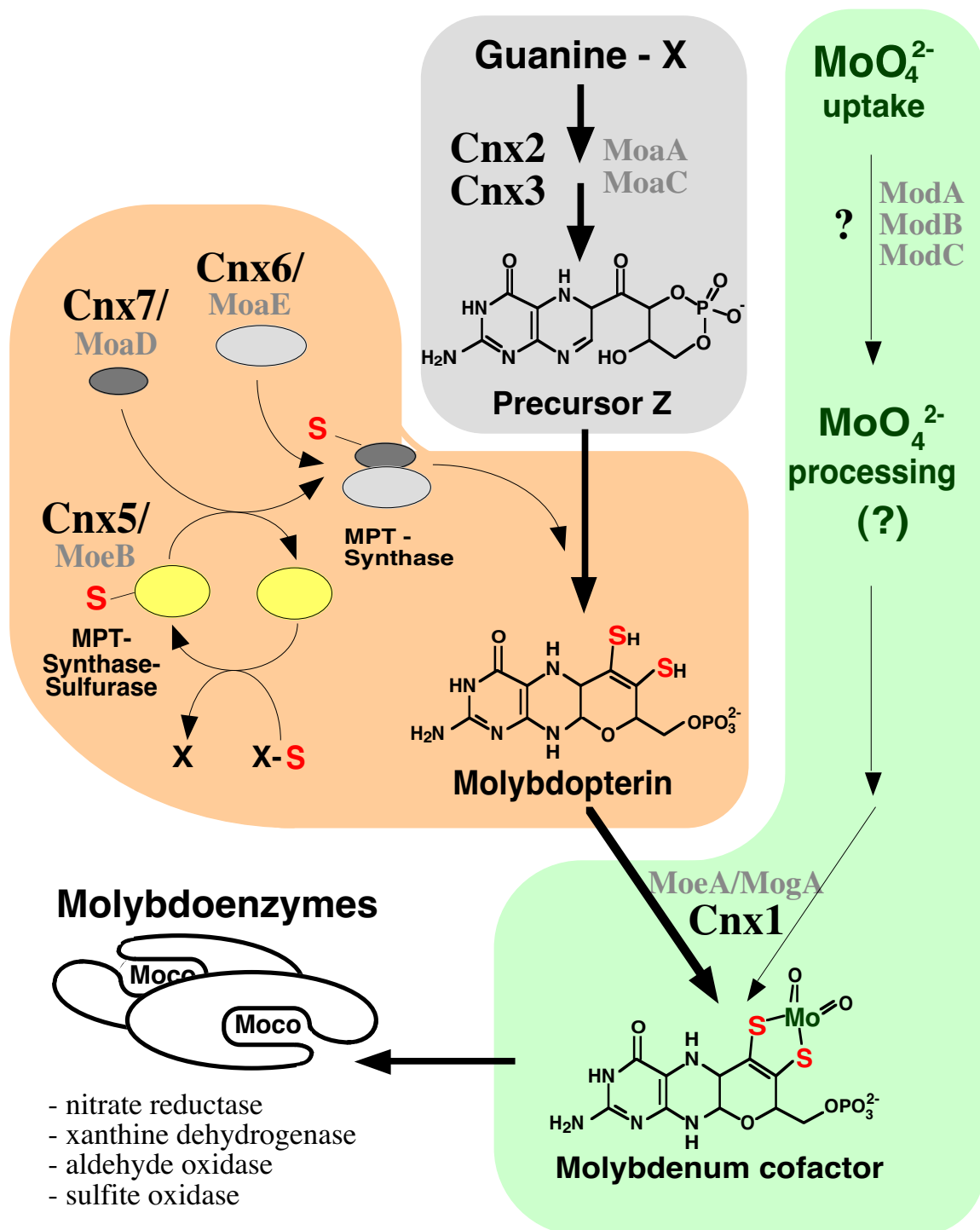
Obwohl ein ubiquitäres Vorkommen des Moco in allen Organismen postuliert wurde (Nason *et al.*, 1971 und 1974) erbrachte die Isolation einer bakteriellen Variante neue Erkenntnisse (Krüger & Meyer, 1986). Die Analyse durch Johnson (1990) stellte eine Strukturmodifikation durch die Anlagerung von GMP an das C4'-Atom der Pterin-Seitenkette über eine Pyrophosphat-Bindung fest. Zusammenfassend sind auch Substitutionen anderer Dinukleotide wie CMP, AMP oder IMP bei prokaryotischen Molybdoenzymen möglich (Rajagopalan & Johnson, 1992). Die alleinige Assoziation dieses MGD mit prokaryotischen Enzymen konnte allerdings durch das Auftreten der MPT-Form des Moco widerlegt werden (Leimkühler *et al.*, 1998).

Gleichzeitig zur Strukturaufklärung des Molybdänkofaktors begann die Aufklärung des Moco-Biosyntheseweges, basierend auf zum größten Teil molekularen, genetischen und biochemischen Untersuchungen von *E. coli*-Moco-Mutanten. Die Analyse der pleiotropen chloratresistenten Mutanten zeigte, dass die 15 an der Biosynthese beteiligten Gene in 5 Operons (*moa*, *mob*, *mod*, *moe* und *mog*) organisiert sind. Rajagopalan (1996) fasste das derzeitige geltende Modell zur Moco-Biosynthese zusammen: Ein letztlich noch nicht eindeutig identifiziertes phosphoryliertes Guanosin-Derivat wird durch eine, von den Genprodukten MoaA und MoaC, katalysierten Ringerweiterung zu einer schwefelfreien Pterinverbindung (Precursor Z) umgewandelt. Im Vergleich zur Biosynthese anderer unkonjugierter und den aus ihnen gebildeten konjugierten Pterinen, wie Biopterin und Folat (Brown, 1985) und der Flavine (Bacher, 1990), wird für diese Umwandlung eine von den bekannten GTP-Cyclohydrolasen I und II verschiedene Cyclohydrolaseaktivität diskutiert (Wuebbens & Rajagopalan, 1995). Im zweiten Schritt innerhalb der Biosynthese wird dem



Precursor Z unter Katalyse der MPT-Synthase (Heterotetramer aus MoaD und MoaE), deren Aktivierung durch die MPT-Synthase-Sulfurase (MoeB) erfolgt (Johnson & Rajagopalan, 1987a+b; Pitterle *et al.*, 1989), die Dithiolengruppierung angehängt und gleichzeitig das an der Alkylseitenkette gebundene zyklische Phosphat dezykliert (Pitterle *et al.*, 1993). Für die Sulfurase wird hierbei die Funktion des Transfers eines Schwefel-Atoms auf die kleine Untereinheit der MPT-Synthase postuliert. Den Mutanten des zweiten Schrittes ist eine auffällige Akkumulation von Precursor Z gemeinsam. Im letzten Schritt wird das Molybdat an die Dithiolen-Gruppierung des MPT komplexiert, wodurch der aktive Moco generiert wird. Da *mogA-E. coli*-Mutanten in der Lage sind, MPT zu synthetisieren und partiell durch hohe Mengen an Molybdat die Enzymaktivität von Molybdoenzymen innerhalb dieser Mutanten repariert werden kann, wird eine Beteiligung des Genproduktes MogA an der Komplexierung postuliert (Hinton & Dean, 1990; Rajagopalan, 1996). Die Genprodukte des *mod*-Operons sind für den Aufbau eines hochaffinen Molybdat-Transporters eines ABC-Typs verantwortlich. Welche möglichen Veränderungen Molybdat *in vivo* durchlaufen könnte, bevor es in MPT inkorporiert wird und so den aktiven Moco bildet, ist noch nicht bekannt. Für die Synthese der Dinukleotidform des Moco in *E. coli* (MGD) sind die Genprodukte des *mob*-Operons (Mob A/B) verantwortlich. Dabei zeigt MobB eine *in vitro* GTPase-Aktivität und eine gesteigerte MGD-Synthese aus MPT *in vitro* (Palmer *et al.*, 1994, 1996).

Aufgrund der ubiquitären Funktion des Moco und der universellen Konservierung der Struktur zwischen Pro- und Eukaryoten lag die Vermutung nahe, daß auch die Biosynthese ähnlich verläuft (Mendel, 1992). Die ersten Hinweise darauf lieferten die Isolierungen der Moco-Synthesegene *cnx1* (Stallmeyer *et al.*, 1995), *cnx2* und *cnx3* (Hoff *et al.*, 1995) aus *Arabidopsis thaliana* mittels funktioneller Komplementation von *E. coli*-Mutanten. Basierend auf den Homologien der isolierten humanen und pflanzlichen Molybdänkofaktor-Biosynthese-Proteinen stellte Mendel (1997) ein erstes Modell der Moco-Biosynthese in Eukaryoten auf (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Modell der Moco-Biosynthese nach Mendel (1997).** Das Modell kombiniert die derzeitigen Daten basierend auf den Homologien der aus *A. thaliana* isolierten Gene (Cnx-Nomenklatur nach Mendel & Müller (1978) und Caboche *et al.*, (1994)) mit den bisherigen Erkenntnissen zur Struktur und Funktion der Moco-Synthese-Gene in *E. coli* (Mo-Nomenklatur nach Rajagopalan, (1996)).

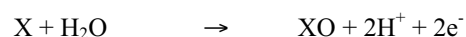
Neben den Gemeinsamkeiten zwischen Pro- und Eukaryoten konnten auch auffällige Unterschiede, bzw. Erweiterungen des Modells, in den beiden Organismen festgestellt werden. Die Existenz eines hochaffinen Molybdat-Transporters, wie er in *E. coli* durch die Genprodukte des *mod*-Operon aufgebaut ist, kann in Eukaryoten noch nicht belegt werden. Das Fehlen der MGD-Form des Molybdänkofaktors kann durch die Abwesenheit von Mob-Homologen in Eukaryoten erklärt werden. Auffällig ist die Fusion einiger *E. coli* Genprodukte zu multifunktionellen Proteinen bei Pilzen, Pflanzen und tierischen Organismen (Stallmeyer *et al.*, 1995 und 1999; Unkles *et al.*, 1997). Erste Hinweise eines Einflusses der in der eukaryotischen Zelle auftretenden Kompartimentierung für die Moco-Biosynthese lieferte die *chl7*-Mutantenanalyse in *A. thaliana*. Diese chloratresistente Mutante weist eine Deregulation des  $\gamma$ -Adaptins, welches am Vesikeltransport beteiligt ist, auf (Crawford *et al.*, 1992; Schledzewski *et al.*, 1999).

### 1.3 Molybdoenzyme

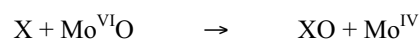
Die Molybdän-enthaltenen Enzyme katalysieren fundamentale metabolische Reaktionen innerhalb der globalen N-, S- und C-Zyklen. Die Molybdoenzyme können zu einer derzeit mehr als 40, zumeist prokaryotische Enzyme mit zum Teil unterschiedlichsten Substratspezifitäten, umfassenden Gruppe zusammengefaßt werden (Hille, 1996; Stiefel, 1997). Allen gemeinsam ist der Katalysemechanismus einer von Enzym zu Enzym alternierenden oxidativen Hydroxylierung, bzw. einer reduktiven Dehydroxylierung (Hille & Massey, 1981; Rajagopalan, 1992). Die generelle Funktion besteht also in einem Transfer eines Sauerstoffatoms zu, bzw. von einem physiologischen Elektronenakzeptor/-donator-Molekül, und so werden die Molybdoenzyme in die Gruppe der Oxotransferasen eingeordnet. Bei den oxidativen Enzymen, welche als Molybdän-Hydroxylasen bezeichnet werden (Bray, 1975), stammt die in das Substrat eingeführte Hydroxylgruppe aus einem Wassermolekül

(Abb. 1.3) (Holm, 1990; Enemark & Young, 1993; Young & Wedd, 1994). Das Mo-Zentrum spielt bei der Hydroxylierung und dem zwei Elektronentransfer aus dem Substrat eine entscheidene Rolle (Bray, 1988). Die Hydroxylgruppe ligandiert als eine  $\mu$ -oxo-Gruppe an das Metall (Rappe *et al.*, 1980). Die während der Reaktion in das Enzym eingeführten Elektronen werden anschließend auf die jeweiligen spezifischen, physiologischen  $e^-$ -Akzeptoren übertragen. Ein Transfer auf unspezifische artifizielle Akzeptoren konnte ebenfalls beobachtet werden (Coughlan, 1980). Mit Ausnahme der bakteriellen Nitrogenase enthalten alle Molybdoenzyme einen mononuklearen Molybdänkofaktor, wobei das Molybdän über eine 1,2 Dithiolengruppe an ein oder zwei Pterinringsysteme gebunden ist (Hille, 1996; George *et al.*, 1996; Collison *et al.*, 1996). Die komplementäre Halbreaktion wird häufig von einem zweiten Reaktionszentrum (z.B. Flavin, Fe-S oder Cytochrom) übernommen. Die beiden Zentren sind durch eine interne Elektronen-Transportkette verbunden. Neben dem intramolekularen Elektronentransport durch das ausgeprägte  $\pi$ -Elektronensystem wird dem Pterin-Gerüst des Moco auch eine Funktion im Redoxpotential-„Tunings“ des aktiven Zentrums nachgesagt (Holm, 1990; Romao *et al.*, 1995; Collison *et al.*, 1996).

I. Sauerstoff-Austausch zwischen dem Substrat X und Wasser



II. Sauerstoffatom-Transfer



III. gekoppelter Protonen-Elektronen-Transfer mit Regeneration des aktiven Zentrums



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Elektronen-Protonen-Übertragung auf Molybdat als katalytisch aktives Metall.**

Basierend auf Sequenzhomologien und spektroskopischen Analysen, können zwei übergeordnete Klassen von Molybdoenzymen identifiziert und unterschieden werden (Hille, 1996). Die Mitglieder der ersten großen Klasse von Molybdoenzymen katalysieren die oxidative Hydroxylierung einer diversen Anzahl von Aldehyden und aromatischen Heterocyclen, denen die Aktivierung einer C-H-Bindung während der Reaktion gemeinsam ist. Vertreter dieser Klasse sind die tierische Xanthinoxidase/dehydrogenase, die Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* und auch die Familie der Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktasen aus *Pyrococcus furiosus*. Die tierische Aldehyd-Oxidoreduktase (E.C.1.2.3.1.) katalysiert im speziellen die Oxidation einer Reihe von Aldehyden oder N-heterozyklischen Verbindungen in Anwesenheit von Sauerstoff (Hall & Krenitsky, 1986). In pflanzlichen Systemen beschrieb Koshiba (1996) eine Beteiligung einer Aldehydoxidase an der Synthese des Auxins Indolylessigsäure und Walker-Simmons *et al.*, (1989) eine Funktion bei der Synthese der Abscisinsäure. Ebenfalls zur ersten großen Klasse gehört die pflanzliche Xanthindehydrogenase, die wie die beschriebenen Aldehyd-Oxidoreduktasen als Monooxydehydroxylase einen anorganischen terminalen Schwefelliganden als Teil des katalytisch aktiven Mo-Zentrums besitzt (Wahl & Rajagopalan, 1982; Wahl *et al.*, 1984). Dieser cyanolysierbare Schwefel, der weder Teil des Apoproteins noch des Pterins ist, wird innerhalb eines Reifungsprozesses in einem terminalen Schritt angelagert. Die Beschreibung mehrerer Mutanten, wie z.B. *ma-1* in *Drosophila melanogaster* (Wahl *et al.*, 1982), *aba1* in *Nicotiana glauca* (Leydecker *et al.*, 1995), *aba3* in *A. thaliana* (Leon-Kloostezel *et al.*, 1996) und *flacca* in der Tomate (Marin & Marion-Poll, 1997) unterstützen diese These.

Die zweite Klasse von Molybdoenzymen besteht aus Enzymen, die typischerweise die Sauerstoffatom-Transfer-Reaktion auf, bzw. von einem möglichen einzelnen Elektronenpaar auf, bzw. von einem Substrat, katalysieren. Zur ersten Familie werden die gut charakterisierten Enzyme der assimilatorischen Nitratreduktase und die Sulfitoxidasen zusammengefaßt. Die zweite Familie dieser Klasse wird durch die DMSO-Reduktase-Familie,

deren Vertreter bis zum heutigen Tag ausschließlich prokaryotischen Ursprungs sind, komplettiert. Innerhalb der DMSO-Reduktase-Familie erfolgt die Ligandierung der  $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_{(1-2)}$ -Einheit über zwei Pterin-1,2 Dithiolat-Komponenten (Schindelin *et al.*, 1996; George *et al.*, 1996). Hierbei ist ein Ligand symmetrisch bidentat, der andere asymmetrisch gebunden in der oxidierten Form und monodentat in der reduzierten Form. Innerhalb dieser Gruppe liefert eine Serin-Seitenkette die Mo-Alkoxo-Bindung.

In Pflanzen konnten die Molybdoenzyme der Nitratreduktase, mehrere Aldehydoxido-reduktasen und eine Xanthindehydrogenase isoliert werden. Den Enzymen ist gemein, dass sie nur als Homodimer aktiv sind und sie neben der Moco-Domäne weitere in den Elektronen-Transport einbezogene prosthetische Gruppen, wie Flavin, Häm oder Fe-S-Zentren, besitzen. Zwischen den Domänen der einzelnen Enzyme ist eine sehr ausgeprägte Homologie erkennbar (Mendel, 1997).

#### **1.4 Sulfitoxidase**

Eine große und bedeutende Familie innerhalb der mononuklearen Molybdoenzyme nimmt die Sulfitoxidase-Familie ein. Innerhalb dieser Gruppe sind die Dioxo-Dehydroxylasen der bekannten Sulfitoxidasen und die assimilatorischen Nitratreduktasen der Algen und höheren Pflanzen zusammengefaßt (Hille, 1996). Sie katalysieren den Sauerstoffatom-Transfer an, bzw. von einem Schwefel-, bzw. Stickstoff-Atom. Die Enzyme zeigen eine starke Inhibition durch Cyanid, deren Sensitivität allerdings ausschließlich auf die reduzierte Form des Enzyms beschränkt ist und vollkommen reversibel zu sein scheint (Coughlan & Rajagopalan, 1980). Die Ligation des  $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2$ -Anteils des aktiven Molybdoenzym erfolgt über ein einzelnes Pterin-1,2 Dithiolat.

Die tierische Sulfitoxidase katalysiert die Oxidation von Sulfit zu Sulfat mit dem physiologischen Elektronenakzeptor Cytochrom c. So kommt ihr eine wichtige Rolle in der

oxidativen Degradation von schwefelhaltigen Aminosäuren, wie Cystein und Methionin, und schwefelhaltiger Membran-Komponenten im tierischen Organismus zuteil. Das tierische Enzym ist im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert und liegt in seiner aktiven Form als Homodimer mit einer apparenten molekularen Masse von 101-110 kDa vor (Johnson & Rajagopalan, 1977). Die gewichtige Rolle der Sulfitoxidase für den Menschen bei der Detoxifizierung von Sulfit wird durch neurologische Abnormalitäten deutlich, die bei SOX-Defizienz (Garrett & Rajagopalan, 1998). Eine auftretende Defizienz führt bereits häufig in der pränatalen Phase zum Tod des Fötus und postnatal sind die Patienten nur wenige Wochen bzw. Monate lebensfähig. Die isolierten Enzyme lassen sich proteolytisch in zwei distinkte Domänen spalten (Johnson & Rajagopalan, 1977), wobei die kleinere etwa 10 kDa große Domäne ein Cytochrom des b<sub>5</sub>-Typs als prosthetische Gruppe enthält und die größere C-terminal liegende Domäne (42 kDa) einer Moco-Domäne entspricht. Beiden Enzymen konnte durch Proteolyse getrennt voneinander katalytische Aktivität nachgewiesen werden (Johnson & Rajagopalan, 1977; Southerland & Rajagopalan, 1978). Durch intensive Studien der Biochemie der Sulfitoxidase mittels Elektronenparamagnetischer-Resonanz-Spektroskopie (EPR), Raman-Spektroskopie und enzymkinetischer Messungen schneller Reaktionen („stopped-flow“-Analyse), konnte ein detailliertes Model des Reaktionsmechanismus postuliert werden (Hille, 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, die in unserer Gruppe durch H. Brinkmann isolierte cDNA mit Homologie zur tierischen Sulfitoxidase aus *G. gallus* eindeutig als eine solche zu identifizieren und das kodierte Protein biochemisch zu charakterisieren. Dabei sollten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede im Vergleich zu den bekannten tierischen Sulfitoxidasen näher beleuchtet werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Identifikation und Charakterisierung eines pflanzlichen Gens aus *Arabidopsis thaliana* mit Homologien zu der Sulfitoxidase aus *Gallus gallus*

Das Übergangsmetall Molybdän spielt für die Physiologie vieler Organismen als Bestandteil des aktiven Zentrums in Molybdoenzymen eine essentielle Rolle. Molybdoenzyme katalysieren für den Organismus wichtige Redox-Reaktionen. In Säugern sind sie für diverse metabolische Prozesse (Schwefel-Entgiftung, Purin-Katabolismus) verantwortlich. In Pflanzen sind Molybdoenzyme an der Nitrat-Assimilation (Nitratreduktase) und der Phytohormon-Synthese (Aldehydoxidase) beteiligt. Bei der tierischen Sulfitoxidase (SOX) (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*) handelt es sich um das am besten charakterisierte eukaryotische Molybdoenzym (Hille, 1996). Es liegt als Homodimer im Intermembran-Raum der Mitochondrien vor und ist an der oxidativen Degradation schwefelhaltiger Aminosäuren und - Membrankomponenten beteiligt. Hierbei katalysiert die SOX die Reaktion  $\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ . Die bei der Reaktion freiwerdenden Elektronen können über die Molybdänkofaktor (Moco)-Domäne auf eine weitere Proteindomäne, die eine Häm-Gruppe des b<sub>5</sub>-Typs beinhaltet, transferiert werden. Von dort erfolgt die Übertragung auf den physiologischen Elektronenakzeptor Cytochrom c.

In Pflanzen läuft die primäre Sulfat-Assimilation, bei der in Chloroplasten Sulfat über Sulfit zu einer aktivierten Schwefelform reduziert wird und so der Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren zur Verfügung steht, der beschriebenen Oxidationsreaktion einer SOX entgegen. Allerdings konnte eine Reoxidation von Sulfit zu Sulfat durch SO<sub>2</sub>-Begasung in Pflanzen dokumentiert werden (Rennenberg & Herschbach, 1996).



Desweiteren zeigten Jolivet *et al.*, (1995b) eine SOX-Aktivität, die an Thylakoidmembranen gekoppelt ist.

Innerhalb dieser Arbeit wurde das erste pflanzliche Gen einer *sox* aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Neben einer Analyse der Genstruktur wurde die *sox* aus *A. thaliana* (At-*sox*) heterolog in *E. coli* exprimiert und biochemisch charakterisiert. Durch die ermittelten biochemischen Daten und die Generierung spezifischer Antikörper konnte im weiteren Verlauf der Arbeit die SOX aus *Nicotiana tabacum* (Nt-SOX) nativ aufgereinigt werden und ein biochemischer Vergleich beider pflanzlichen Sulfitoxidasen vorgenommen werden.

### 2.1.1 Analyse der At-*sox*-cDNA

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit stand die cDNA-Sequenz der pflanzlichen SOX aus *Arabidopsis thaliana* (At-*sox*) zur Verfügung.

Durch eine Datenbankanalyse mit der tierischen SOX Aminosäuresequenz aus *Gallus gallus* wurde ein *A. thaliana* EST-Klon identifiziert, der im folgenden einer genaueren Untersuchung unterzogen wurde. Der cDNA-Klon (AV540461) wurde vom MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan bezogen. Die Sequenz einer Länge von 1443 Nukleotiden wurde über PCR-Amplifikation durch mutagenisierende Oligonukleotide *EcoRI* und *BamHI* in den pBluescript SK+-Vektor kloniert. Eine doppelsträngige Sequenzierung ergab einen offenen Leserahmen, der sich von Position 34 bis Position 1212 erstreckt und mit dem Stopcodon TTG endet. Damit kodiert die At-*sox* für ein 393 Aminosäuren umfassendes Protein, für das eine Molekulargewichtsgröße von 43,3 kDa berechnet werden konnte. Zur Überprüfung der Vollständigkeit des offenen Leserahmens wurde eine amplifizierte *A. thaliana* cDNA-Bank (Lamda-YES) mit einem radioaktiv-markierten Fragment des AV540461-EST-Klons mit Standardmethoden gescreent und

unter stringenten Bedingungen hybridisiert und gewaschen (persönliche Mitteilung H. Brinkmann). Nach der Isolation positiver Kolonien und Excision der Phagen-DNA in Plasmide entsprechend den Herstellerangaben, ergab eine Sequenzierung ausschließlich identische „full length“-Klone, mit einer Insertionsgröße von 1437 Nukleotiden. Angesichts dieser Ergebnisse kann von der Vollständigkeit des kodierenden Bereiches der *At-sox* innerhalb des EST-Klons AV540461 ausgegangen werden. In der Abb. 2.1 sind Aminosäuren, die an der Kofaktor- und/oder Substrat-Bindung beteiligt sind (Kisker *et al.*, 1997), durch Fettschrift gekennzeichnet. Auf diese Aminosäuren wird im Kapitel 2.1.3 nochmals eingegangen.

```

1                                     M  P  G  I  R
      AATTCCCGGGTCGACCCACGCGTCCGCCTCCTCGAAAGAAGA  ATG  CCT  GGA  ATT  AGA
6  G  P  S  E  Y  S  Q  E  P  P  R  H  P  S  L  K  V
   GGT  CCT  TCG  GAA  TAC  TCG  CAG  GAA  CCA  CCT  CGT  CAC  CCT  TCT  CTC  AAG  GTC
23  N  A  K  E  P  F  N  A  E  P  P  R  S  A  L  V  S
   AAC  GCC  AAG  GAA  CCT  TTC  AAC  GCC  GAG  CCT  CCC  CGC  TCG  GCC  TTA  GTC  TCA
40  S  Y  V  T  P  V  D  L  F  Y  K  R  N  H  G  P  I
   TCT  TAT  GTC  ACT  CCC  GTC  GAC  CTT  TTC  TAC  AAG  CGA  AAT  CAT  GGT  CCC  ATC
57  P  I  V  D  H  L  Q  S  Y  S  V  T  L  T  G  L  I
   CCC  ATT  GTT  GAT  CAC  CTT  CAA  AGC  TAC  TCC  GTC  ACC  CTT  ACT  GGA  TTG  ATC
74  Q  N  P  R  K  L  F  I  K  D  I  R  S  L  P  K  Y
   CAG  AAC  CCG  AGA  AAG  CTC  TTT  ATC  AAA  GAC  ATC  AGG  TCC  CTC  CCA  AAG  TAC
91  N  V  T  A  T  L  Q  C  A  G  N  R  R  T  A  M  S
   AAT  GTT  ACT  GCT  ACT  CTT  CAG  TGT  GCC  GGT  AAC  AGA  AGG  ACT  GCC  ATG  AGC
108 K  V  R  N  V  R  G  V  G  W  D  V  S  A  I  G  N
   AAA  GTT  AGG  AAT  GTT  AGA  GGT  GTT  GGA  TGG  GAT  GTT  TCT  GCT  ATT  GGC  AAC
125 A  V  W  G  G  A  K  L  A  D  V  L  E  L  V  G  I
   GCT  GTC  TGG  GGT  GGG  GCG  AAA  CTG  GCC  GAT  GTT  CTT  GAG  CTT  GTG  GGG  ATA
142 P  K  L  T  A  S  T  N  L  G  A  R  H  V  E  F  V
   CCA  AAG  CTG  ACT  GCT  TCT  ACC  AAT  TTA  GGA  GCC  AGA  CAT  GTT  GAG  TTC  GTT
159 S  V  D  R  C  K  E  E  N  G  G  P  Y  K  A  S  I
   AGT  GTT  GAT  CGC  TGT  AAG  GAG  GAA  AAT  GGG  GGC  CCT  TAT  AAG  GCG  TCA  ATC
176 T  L  S  Q  A  T  N  P  E  A  D  V  L  L  A  Y  E
   ACT  CTA  AGT  CAA  GCC  ACA  AAT  CCT  GAA  GCG  GAT  GTT  CTA  CTC  GCT  TAT  GAG
193 M  N  G  E  T  L  N  R  D  H  G  F  P  S  R  V  V
   ATG  AAT  GGA  GAG  ACC  CTG  AAC  AGG  GAT  CAC  GGA  TTT  CCG  TCA  AGG  GTG  GTT
210 V  P  G  V  I  G  A  R  S  V  K  W  L  D  S  I  N
   GTC  CCT  GGT  GTG  ATT  GGT  GCT  CGT  TCG  GTC  AAA  TGG  CTT  GAT  TCC  ATC  AAT
227 V  I  A  E  E  S  Q  G  F  F  M  Q  K  D  Y  K  M
   GTC  ATC  GCT  GAA  GAA  AGC  CAG  GGA  TTC  TTC  ATG  CAA  AAA  GAT  TAC  AAA  ATG
244 F  P  P  S  V  N  W  H  N  I  N  W  S  S  R  R  P
   TTT  CCA  CCC  TCT  GTC  AAT  TGG  CAT  AAT  ATC  AAC  TGG  TCC  TCT  AGG  AGA  CCG

```

```

261  Q  M  D  F  P  V  Q  S  A  I  C  S  V  E  D  V  Q
    CAA ATG GAT TTC CCT GTT CAG AGT GCA ATC TGC TCT GTG GAG GAT GTG CAA
278  M  V  K  P  G  K  V  S  I  K  G  Y  A  V  S  G  G
    ATG GTG AAG CCT GGA AAG GTA AGT ATC AAA GGA TAT GCG GTT TCA GGA GGT
295  G  R  G  I  E  R  V  D  I  S  L  D  G  G  K  N  W
    GGA CGC GGG ATA GAA AGA GTG GAC ATA TCC CTG GAT GGA GGC AAA AAC TGG
312  V  E  A  S  R  T  Q  E  P  G  K  Q  Y  I  S  E  H
    GTG GAA GCT TCT AGA ACG CAG GAA CCA GGA AAG CAG TAC ATC TCA GAA CAC
329  S  S  S  D  K  W  A  W  V  L  F  E  A  T  I  D  V
    AGC TCC AGT GAC AAA TGG GCA TGG GTG TTG TTT GAA GCC ACC ATT GAT GTT
346  S  Q  T  T  E  V  I  A  K  A  V  D  S  A  A  N  V
    TCA CAG ACT ACA GAG GTC ATC GCC AAA GCG GTT GAT TCG GCG GCG AAT GTT
363  Q  P  E  N  V  E  S  V  W  N  L  R  G  V  L  N  T
    CAA CCG GAA AAT GTG GAG TCG GTG TGG AAC CTA AGA GGA GTT CTC AAC ACT
380  S  W  H  R  V  L  L  R  L  G  H  S  N  L
    TCG TGG CAC CGT GTC CTT CTC CGG CTT GGC CAC TCT AAC TTG TAGACCAAGTT
    ACCACTATGCGTCTGGTCTCTCTTTTATCTTTTCTTTAAGAACTAAAAACATCCTTGAATATGCTTGTGTC
    CTTGTGGATCTGTGAGAGCAAAATACTGTTTATAGTTAAATAAAATGGGAAAACCCATCTGTTGTCA
    TGTGGTGGATTATAAAATTATTTATTTATATGATAGAACTGTTATTCCTATTATATATTAATGAAAT
    CATATGGTTGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGCTCTAGAGGATCCACTAGTTCTAGAG
    CG

```

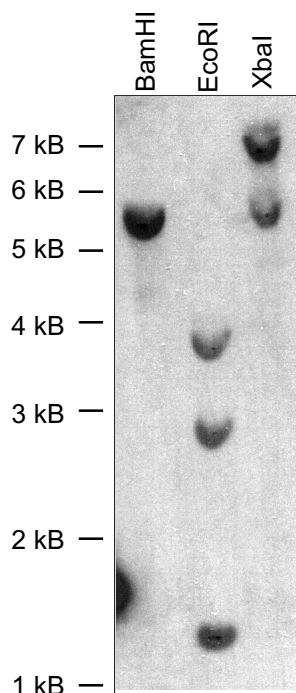
**Abb. 2.1: Nukleotidsequenz der aus *A. thaliana* isolierten cDNA mit Homologien zu tierischen Sulfitoxidasen und die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäure-Zusammensetzung.** Durch Fettschrift sind hoch-konservierte Aminosäuren, die an der Kofaktor- und/oder Substrat-Bindung beteiligt sind (Kisker *et al.*, 1997), gekennzeichnet. Der offene Leserahmen auf der cDNA-Sequenz erstreckt sich von Position 34 bis Position 1212 und kodiert für ein 393 Aminosäuren umfassendes Protein, für das ein Molekulargewicht von 43,3 kDa berechnet werden kann.

### 2.1.2 Analyse der genomischen Sequenz der *At-sox*

Zur Charakterisierung der *At-sox* wurde neben der Analyse der cDNA-Sequenz auch die genomische Organisation aufgeklärt. Neben der Verifizierung der *At-sox* im Genom von *Arabidopsis thaliana ssp. Columbia* durch einen genomischen Southernblot, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Exon-Intron-Struktur und die Lokalisation des Genlocus näher untersucht.

Abbildung 2.2 zeigt den durchgeführten Southernblot, der unter hoch-stringenten Bedingungen (Hybridisierung bei 65°C, Waschen bei 60°C mit 1xSSC-0,1xSSC + 0,1%

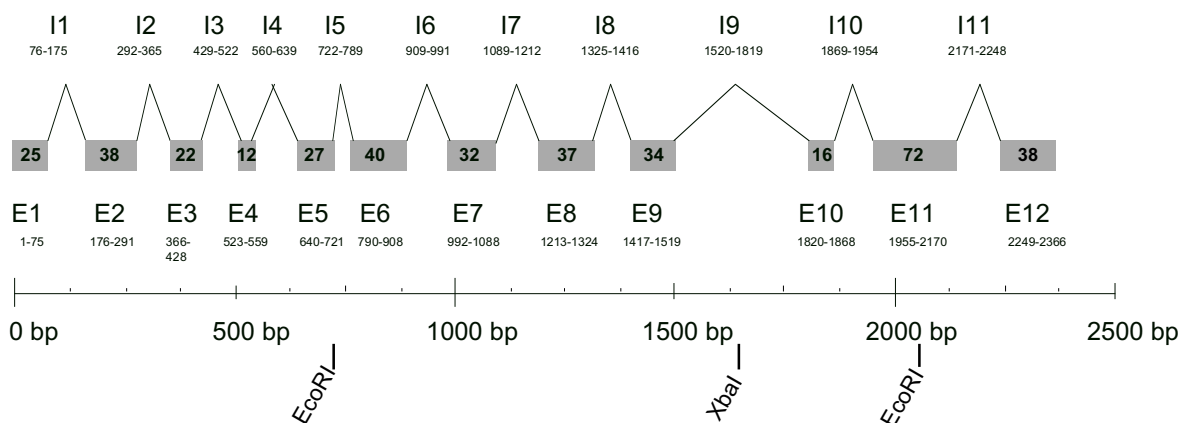
SDS) unter Verwendung der Standardmethoden und dem Einsatz der gesamten Fluorescein-markierten *At-sox*-cDNA hybridisiert wurde. Es konnten ein positives *Bam*HI-Fragment von etwa 5,2 kB, insgesamt drei hybridisierende *Eco*RI-Fragmente von 1,4; 2,6 und 3,3 kB und zwei positive *Xba*I-Fragmente von etwa 5,3 und 7,0 kB identifiziert werden. In der Abbildung 2.3. sind die intern-liegenden Restriktionsstellen der für den Verdau der genomischen DNA benutzten Restriktionsenzyme eingezeichnet. Die sich daraus ergebenden Fragmentlängen stimmen mit den im Southern-Blot ermittelten Fragmentgrößen überein, so dass es sich bei der *At-sox* im Genom von *Arabidopsis thaliana* aller Wahrscheinlichkeit nach um ein „single-copy“-Gen handelt.



**Abb. 2.2: Restriktionsverdau und Autoradiogramm von genomischer DNA aus *A. thaliana* ssp. *Columbia*.** Die Hybridisierung erfolgte nach Standardbedingungen bei 65°C; Waschen bei 60°C mit 1xSSC-0,1xSSC + 0,1% SDS unter Verwendung der gesamten Fluorescein-markierten *At-sox*-cDNA.

Auf der Grundlage dieses Ergebnisses wurde zur Isolierung der genomischen Sequenz und zur anschließenden Sequenzierung eine amplifizierte genomische Phagenbank aus *A. thaliana* ssp. *Columbia* (500.000 PFU, partiell verdaute in EMBL4/*Eco*RI einklonierte Gesamt-DNA mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 15 kb) unter Verwendung der radioaktiv markierten „full-length“ *At-sox*-cDNA unter hoch-stringenten Bedingungen

gescreent (persönliche Mitteilung H. Brinkmann). Durch die Sequenzierung konnte die Exon-Intron-Struktur der genomischen Sequenz der *At-sox* schematisch dargestellt werden. Die genomische Sequenz enthält insgesamt 11 Introns, wobei die Größen zwischen 67 bp (Intron 5) und 299 bp (Introns 9) schwanken. Die Exon-Intron-Übergänge entsprechen alle der allgemein gültigen GT-AG-Regel.



Accession-Nr. ATAC010797

**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur der genomischen Sequenz der *At-sox* des BAC-Klons F28J7 (die Übergänge unterliegen alle der GT-AG-Regel). Die im Southern verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

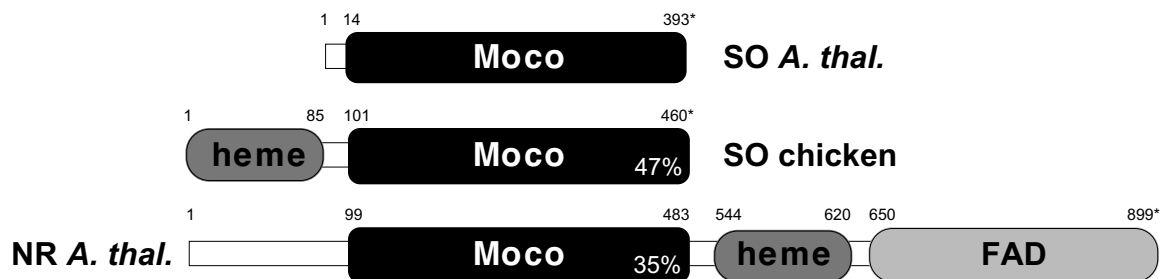
Ein weiterer Punkt der genomischen Charakterisierung von *At-sox* beinhaltete die Sequenzierung der unmittelbaren Umgebung des Gens sowie seine Lokalisation im Genom. Unmittelbar im Anschluß an die genomische Sequenzierung von *At-sox* wurde im Rahmen des Arabidopsis-Genom-Projektes die 89,15 kB umfassende Region des BAC-Klons F28J7 (accession nr. ATAC010797) in die Datenbank eingespeist. Somit konnte auf die klassischen Methoden des Gen-Mappings durch RFLP-Marker verzichtet werden. Die Lage des BAC-Klons F28J7 wurde auf Chromosom III (23,2 MB) in der Nähe des RI-Markers mi74b bei 5,8 cM festgelegt. Durch eine detaillierte Sequenzanalyse des Klons F28J7

konnte die genomische Umgebung von *At-sox* genauer definiert werden. Von besonderem Interesse war ein Abschnitt, der ungefähr 3,4 kB „downstream“ des *At-sox*-Translationsstartpunktes zu identifizieren war. Dieser Bereich enthält eine 1,5 kB umfassende Sequenz, die Intron-frei für ein Häm-Protein des Cytochrom P450-Typs kodiert. Der offene Leserahmen von 1488 Nukleotiden kodiert für 496 Aminosäuren, was eine berechnete molekulare Masse des translatierten Genproduktes von 56,46 kDa ergibt. Zwischen dem Stoppcodon der *At-sox* und dem Translationsstartpunkt des Cytochrom P450 liegen 1,0 kB und die Translationsrichtung beider Gene ist identisch.

Allgemein konnte durch die Analyse der genomischen Sequenz der *At-sox* die Vollständigkeit des identifizierten EST-Klons AV540461 bestätigt werden. Im Gegensatz zur tierischen SOX (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*) konnte festgestellt werden, dass es sich bei der pflanzlichen SOX aus *A. thaliana* um ein ausschließlich aus einer Moco-Domäne bestehendes Protein handelt.

### 2.1.3 Sequenzalignment der At-SOX im Vergleich mit anderen Sulfitoxidasen

Mit Hilfe der Datenbank <http://www.expasy.ch/tools/clustalW> wurde die identifizierte At-SOX auf Aminosäureebene mit anderen bekannten tierischen Sulfitoxidasen verglichen. Auf Aminosäureebene ergab sich eine Homologie von 47% zur Aminosäuresequenz der SOX aus *G. gallus*. Im Vergleich dazu lag die Homologie zur Nitratreduktase aus *A. thaliana*, einem Molybdoenzym des gleichen Organismus, im Bereich der Moco-Domäne bei nur 35%. Der pflanzlichen Sequenz aus *A. thaliana* fehlt allerdings ein großer Bereich des N-Terminus, der insgesamt über 100 Aminosäuren umfasst. Diese N-terminale Deletion der pflanzlichen SOX-Sequenz beinhaltet innerhalb der tierischen Sequenzen (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*) neben den ersten 23 Aminosäuren, welche für die Lokalisation der tierischen SOX im Intermembranraum der Mitochondrien beschrieben ist, auch die Häm-Domänen Sequenz.



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der homologen Bereiche der SOX aus *A. thaliana*, *G. gallus* und der Nitrat-reduktase aus *A. thaliana*. Die Homologiewerte beziehen sich auf die Aminosäure-Identitäten der konservierten Moco-Domänen zu der At-SOX.

[illegible]

Im Alignment (Abb. 2.5) der Moco-Domänen der dargestellten Sulfitoxidasen und der Nitratreduktase aus *A. thaliana*, können insgesamt 5 Bereiche mit allgemein hochkonservierten Aminosäuren (schwarz unterlegte AS), bzw. nur in den Sulfitoxidasen konservierten Aminosäuren (grau unterlegte AS) identifiziert werden.



Die durch die Kristallstruktur der SOX aus *G. gallus* bekannten Subdomänen der Moco-Domäne (Kisker *et al.*, 1997) können auch in der pflanzlichen Proteinsequenz erkannt werden. Neben der MPT-bindenden Domäne mit dem Cystein, welches an der Moco-Bindung beteiligt ist, wird auch in der Aminosäuresequenz der pflanzlichen SOX aus *A. thaliana* eine zweite sogenannte Dimerisierungsdomäne erkennbar. Die hoch-konservierten Aminosäuren dieser Domäne bilden bei den tierischen Sulfitoxidasen die Grundlage für die Dimerbildung (Kisker *et al.*, 1997).

#### **2.1.4 Datenbankanalyse zur Identifizierung von putativen posttranslationalen Modifikationsstellen und funktionellen Sequenzmotiven**

Zur ersten Aufklärung der Funktion von At-SOX wurde die Aminosäuresequenz einer Datenbankanalyse (<http://www.expasy.ch/tools/PrositeScan>) im Hinblick auf die Identifizierung möglicher funktioneller Sequenz- sowie posttranslationaler Modifikationsmotive unterzogen. Die nachfolgende Tabelle 2.1 listet diese putativen Motive auf.

Mit einer Homologie von 86% wurde im Bereich der Aminosäuren 71-105 ein eukaryotisches Molybdopterin-Oxidoreduktase-Sequenzmotiv identifiziert. Dieses Motiv zeigt mit seiner hohen Homologie die evolutive Abstammung der untersuchten At-SOX-Sequenz zu anderen Molybdoenzymen.

Auffällig ist das häufige Vorkommen posttranslationaler Phosphorylierungsstellen mit unterschiedlicher Kinasespezifisierung. Dies deutet auf eine mögliche Regulation der Enzymaktivität durch reversible Übertragung einer  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP, oder einem anderen möglichen Nukleotidtriphosphat, durch verschiedene Kinasen hin. Eine solche posttranslationale Regulation durch Phosphorylierung konnte für die Nitratreduktase beschrieben werden (Crawford *et al.*, 1996).

Bei der N-Myristilierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, bei der die 14 C-Atome lange, gesättigte Fettsäure Myristinsäure über eine Amidbindung an einem Glycinrest kovalent an das Protein gebunden ist. Durch die Myristinsäure erfolgt eine Fixierung des Proteins an Membranen, indem sie als Verankerung innerhalb einer der beiden Phospholipid-Schichten wirkt. Allerdings ist für die dargestellten Sequenzmotive einer solchen möglichen Myristilierung die Lage nicht unbedingt am N-Terminus zu erkennen, so dass keine Eindeutigkeit besteht.

Die Aminosäure-Sequenz der At-SOX wurde einer weiterführenden Datenbankanalyse (<http://www.expasy.ch/tools/psort>) bezüglich putativer Targeting-Signalsequenzen unterzogen. Hierbei konnte eine hohe Homologie zur beschriebenen SKL-Peroxisomen-Signalsequenz (Gietl, 1996) nachgewiesen werden. Die At-SOX endet mit den Aminosäuren S-N-L am C-Terminus, was der bekannten Zielsteuerungssequenz sehr ähnlich ist. Die Variabilität der vorletzten Aminosäure scheint hierbei möglich zu sein.

Aufgrund dieser Ergebnisse, die durch eine Datenbankanalyse der AS-Sequenz ermittelt wurden, konnte folgende Charakterisierung erfolgen. Bei der untersuchten Sequenz handelt es sich um eine Molybdopterin-Oxidoreduktase mit hohen Homologien zu tierischen Sulfitoxidasen. Sie unterscheidet sich im Vergleich zu den bekannten Sulfitoxidasen durch ein Fehlen der N-terminalen Zielsteuerungssequenz für Mitochondrien und der ebenfalls am N-Terminus liegenden Häm-Domäne. Im Gegensatz dazu scheint eine Lokalisation in Peroxisomen durch ein C-terminales Sequenzmotiv nahe zu liegen. Desweiteren sind posttranslationale Modifikationen unterschiedlichster Art und Weise durch die identifizierten Modifikationsstellen möglich.

**Tabelle 2.1.: Putative Modifikationssignale und funktionelle Sequenzmotive innerhalb der At-SOX-Sequenz**

Motiv	Position	Modifikation/Funktion	Homologie
NVTA	91-94	N-Glykolisierung	100%
NWSS	254-257		100%
NTSW	378-381		100%
SLK	19-21	Phosphorylierung durch Proteinkinase C	100%
SVK	218-220		100%
SSR	256-258		100%
SRR	257-259		100%
SIK	285-287		100%
SDK	331-333		100%
TPVD	43-46	Phosphorylierung durch Caseinkinase II	100%
TNPE	181-184		100%
SVED	272-275		100%
SSSD	329-332		100%
GNNRRTA	100-105	N-Myristilierung	100%
GAKLAD	129-134		100%
GVIGAR	212-217		100%
GGGRGI	293-298		100%
GVLNTS	375-380		100%
	71-105	eukary. Molybdopterin Oxidoreduktase	86%
SNL	391-393	Lokalisations-Signalsequenz für Peroxisomen (PTS1)	

## 2.2 Klonierung der *At-sox* und chromatographische Reinigung des rekombinant exprimierten SOX-Proteins (rAt-SOX)

Als Grundlage für eine biochemische Charakterisierung der pflanzlichen SOX wurde die *At-sox*-cDNA-Sequenz in Vektoren eines prokaryotischen Expressionssystems (pQE-Serie, QIAGEN) kloniert und das nach der Expression und Reinigung über Metallaffinitätschromatographie erhaltene Protein zur biochemischen Charakterisierung genutzt.

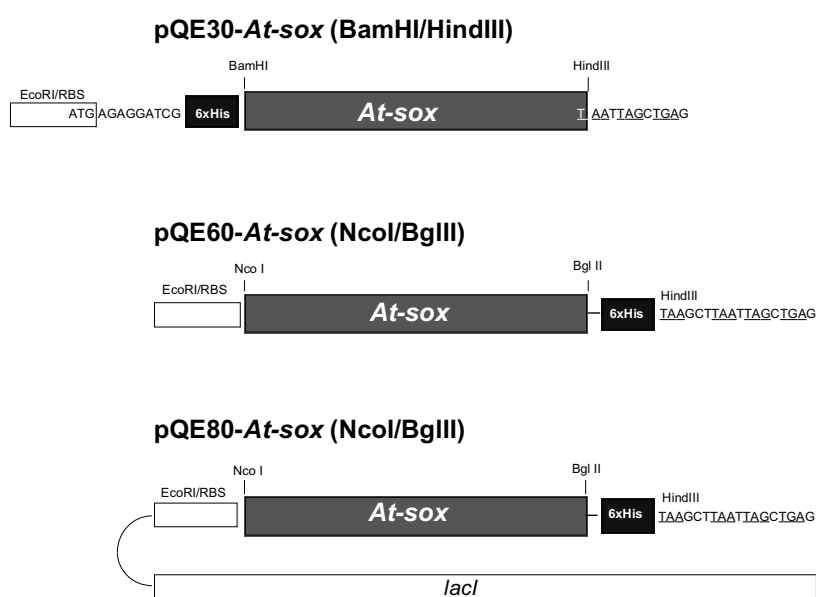
### 2.2.1 Klonierung verschiedener *At-sox*-Expressionskonstrukte

Die *At-sox* wurde in verschiedenen Expressionsvektoren der pQE-Serie eingeführt. Durch die Klonierung in den pQE-30-Vektor, über die Restriktionsstellen *Bam*HI und *Hind*III, wurde dem Protein eine N-terminale Extension von 13 Aminosäuren angehängt. Innerhalb dieser Extension lagen 6 Histidine, die eine Reinigung über Ni-NTA ermöglichten. Das Startmethionin wurde dabei von der Vektorsequenz kodiert. Affinitätschromatographische Reinigungen über Ni-NTA-Matrix zeigten ein verringertes Bindungsvermögen dieser mit sechs Histidinen N-terminal-markierten At-SOX. Ein durchgeführter Hydrophobizitätsplot ergab innerhalb der At-SOX-Sequenz einen hydrophoben Bereich am N-Terminus, der wahrscheinlich für ein „Einklappen“ der Histidin-Markierung in das Proteininnere verantwortlich war.

Aus diesem Grunde wurde im weiteren Verlauf der Arbeiten zunächst ein pQE-60-Vektor zur rekombinanten Expression verwendet. Innerhalb dieses Vektors wurde die At-SOX mit dem Protein-authentischen Startmethionin und einer C-terminalen Extension von 8 Aminosäuren translatiert. Die Extension am C-Terminus umfaßte neben den 6 Histidinen zwei weitere Aminosäuren, was durch die notwendige Entfernung des Stoppcodons und

Einführung einer *Bgl*II-Restriktionsstelle durch Mutagenese erfolgte. An der zweiten Aminosäureposition der ursprünglichen Sequenz des Proteins kam es durch Generierung einer *Nco*I-Restriktionsstelle zu einem Austausch von einem Prolin zu einem Alanin.

Spätere Fragestellungen, die sich hauptsächlich mit der Aufreinigung eines möglichst hohen Anteils an aktiven Enzyms beschäftigten, machten eine Expression im Kanamycin-resistenten Bakterienstamm TP 1000 (Palmer *et al.*, 1996) notwendig. Da aber eine Überexpression im pQE-60-Vektor mit der Kotransformation des pREP4-Vektors (kodiert für Laktose-Repressor *lacI* des *lac*-Operons) gekoppelt ist und dieser durch Kanamycin selektiert wird, mußte ein weiterer Vektor erstellt werden. Der pQE-80-Vektor kodiert zusätzlich für den Laktose-Repressor (*lacI*). Im Gegensatz zu den Herstellerangaben wurde die *At-sox*-Sequenz aus bereits beschriebenen Gründen nicht mit einer N-terminalen Histidin-Markierung im pQE-80 translatiert. Vielmehr wurde eine *Eco*RI/*Hind*III-Kassette aus dem pQE-60-*At-sox* geschnitten und in den ebenfalls *Eco*RI/*Hind*III-verdauten pQE-80-Vektor kloniert. So wurde die pREP4-unabhängige Expression des pQE80-Vektors mit der notwendigen C-terminalen Lokalisation der Histidin-Markierung kombiniert. Mit dem pQE-80-*At-sox*-Vektor wurden alle weiteren Überexpressionen optimiert.



**Abb. 2.6: Schematische Darstellung der prokaryotischen Expressionskonstrukte, die für die Überexpression genutzt wurden.** Die Klonierung in die 5'-Schnittstelle und die 3'-Schnittstelle der jeweiligen Vektoren erfolgte unter Verwendung von mutagenisierenden Primern.

### **2.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung der rAt-SOX**

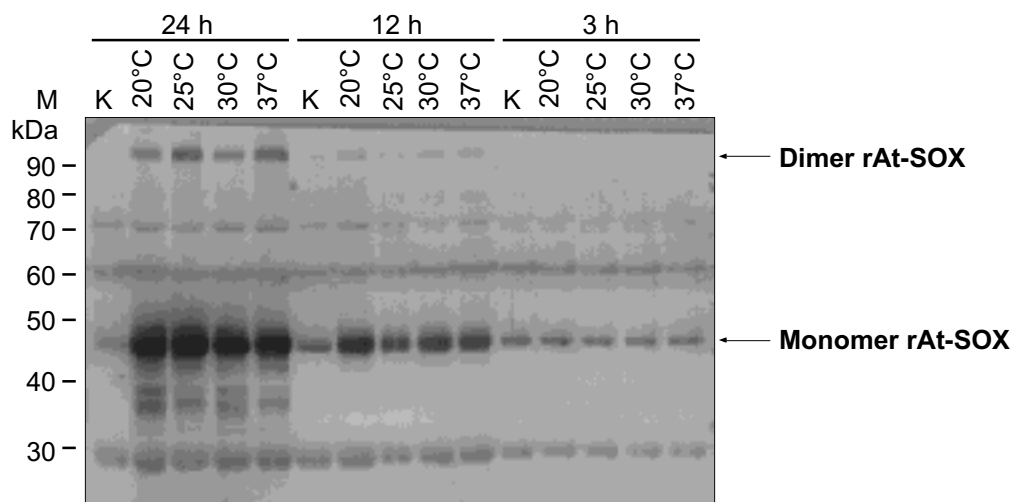
Es war notwendig, Expressions-Bedingungen zu finden, bei denen eine möglichst hohe Menge des exprimierten Proteins der rAt-SOX in *E. coli* im Cytoplasma gelöst vorlag und enzymatische Aktivität aufwies. Nur dies macht eine Extraktion unter nicht-denaturierenden Pufferbedingungen möglich. Ist die Translationsgeschwindigkeit des rekombinant exprimierten Proteins zu hoch, ist die Wahrscheinlichkeit zur Einnahme der nativ gefalteten Konformation verringert. Unphysiologisch falsch gefaltete Proteine tendieren zur Agglomeration, bei der sich hydrophobe Bereiche der Proteinoberfläche aneinanderlagern und sich so „Inclusion Bodies“ bilden, die nur unter denaturierenden Bedingungen (Bsp. 8 M Harnstoff) die Aufreinigung des Proteins möglich machen. Die sich anschließende notwendige Renaturierung des Proteins zum katalytisch wirksamen Enzym resultiert in einem sehr hohen Verlust an Proteinmenge.

#### **2.2.2.1 Optimierung der Expressionsrate der rAt-SOX**

Zunächst wurden die Auswirkungen der Anzuchttemperatur, Zelldichte bei Induktion, Konzentration des Expressions-Induktors IPTG und die Expressionsdauer auf die Reduzierung der Translationsgeschwindigkeit und so auch auf die Löslichkeit des exprimierten Proteins untersucht. Außerdem wurde die rAt-SOX in verschiedenen zur Verfügung stehenden Bakterienstämmen exprimiert und dann die SOX-Aktivität verglichen.

Die Überexpression der rAt-SOX wurde im kleinen Maßstab in 5 ml-Kulturen bei einer Anzuchttemperatur von 20-37°C, einer Zelldichte bei der Induktion von 0,1-1,0, einer Expressionsdauer von 0-24 h und einer variierenden IPTG-Konzentration von 0,1-5 mM

untersucht. Nach der jeweiligen Expressionsdauer wurden die Bakterien geerntet und durch eine Sonifikation und anschließende Zentrifugation die lösliche Proteinfraction (Überstand) und die unlösliche Proteinfraction (Pellet) voneinander getrennt. Die Expressionsraten wurden in den erhaltenen Proteinfractionen immunologisch verglichen (Abb. 2.7). Auf dem Immunoblot kann man spezifische Signale in der richtigen Molekulargröße für ein Dimer und eine monomere Form des rAt-SOX-Protein erkennen.



**Abb. 2.7: Expressionsanalyse von rAt-SOX.** Es wurden 5 ml Expressionsminikulturen unter den angegebenen Bedingungen (Expressionstemperatur, Expressionsdauer) mit 0,1 mM IPTG bei einer Zelldichte  $OD_{600}$  von 0,1 induziert, die Zellen in 1/5 Lysis-Puffer solubilisiert und der klare Überstand (30  $\mu$ g Protein des *E. coli*-Gesamtextraktes) nach SDS-PAGE durch Immunoblot mit polyklonalen At-SOX-Antikörpern (1:500) analysiert. K: Negativkontrolle der Expression durch fehlende IPTG-Induktion, M: 10 kDa Standard-Proteine.

Die immunologischen Nachweise der Expression der rAt-SOX zeigten einen hohen Anteil des löslichen Proteins im Vergleich zum Gesamtproteingehalt. Zwischen 40–45 % des Gesamtproteins konnte nach der Expression des pQE80-*At-sox*-Vektors in *E. coli* als rAt-SOX verifiziert werden. Die Abb. 2.7 zeigt, dass die Ausbeute an löslichem Protein mit der

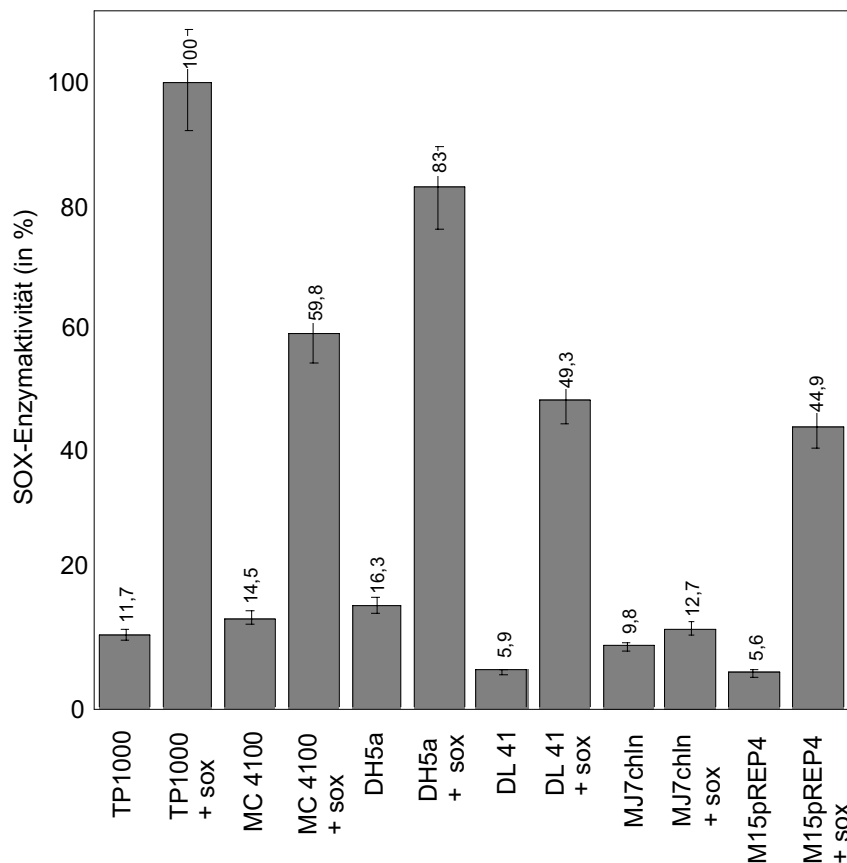
Expressionsdauer signifikant zunahm (24 h) und nur gering durch die Temperatur (20°C-37°C) beeinflusst wurde. Eine geringe Zelldichte vor der Induktion und eine niedrige Konzentration des Expressions-Induktors IPTG erwiesen sich begünstigend für die Expression und spätere Ausbeute.

Zur Messung der enzymatischen Aktivität des überexprimierten Proteins der rAt-SOX wurde als Elektronenakzeptor Ferricyanid gewählt. Bei diesem Assay wird durch eine Reduktion des Ferricyanids die Absorptionsverringerng bei 420 nm photometrisch verfolgt. Die Sulfit-Abhängigkeit dieser Reaktion wurde durch Negativkontrollen ohne Sulfit im Ansatz überprüft. Verschiedene Bakterienstämme wurden unter identischen Expressionsbedingungen (ÜN; 37°C; 0,1 mM IPTG) angezogen. Nach Extraktion des Gesamtproteins durch Sonifikation des resuspendierten Bakterienpellets wurde die SOX-Aktivität der einzelnen Proteinextrakte bestimmt. Die Messung der OD<sub>420</sub> wurde mit 20 µg Gesamtprotein gestartet und über 60 sec photometrisch verfolgt. Die ermittelten Anfangssteigungen ergaben den relativen Umsatz an Sulfit/min.

Die Überexpression der rAt-SOX wurde in allen Bakterienzellen immunologisch überprüft und lag im gleichen Konzentrationsbereich. Die höchste SOX-Aktivität konnte im TP1000-Stamm (Palmer *et al.*, 1996) gemessen werden. Dieser Stamm wurde mittels einer Kanamycin-Kassette im *mobAB*-Loci mutagenisiert und akkumuliert in hoher Menge MPT. Eine MPT-Limitierung kann daher bei einer Überexpression im TP1000-Stamm ausgeschlossen werden. Bei dem rAt-SOX-Protein, welches in dem für die pQE-Serie der Firma QIAGEN bevorzugten *E. coli*-Stamm M15pREP4 exprimiert wurde, konnte im Vergleich dazu nur 44,9% der SOX-Aktivität gemessen werden. Dieser Wert konnte sowohl bei der Expression der rAt-SOX in dem *E. coli*-Amplifikationsstamm DH5α (83% SOX-Aktivität), als auch im für TP1000 korrespondierenden Wildtyp-Stamm MC4100 (59,8% SOX-Aktivität), überschritten werden. Bei der Expression der rAt-SOX in der



*E. coli*-Moco-Mutante MJ7chlN konnte ausschließlich inaktives Protein gereinigt werden. Diese Mutante weist einen Defekt in der an der Moco-Biosynthese beteiligten MPT-Synthase-Sulfurase auf, der dazu führt, dass kein MPT gebildet wird.



**Abb.2.8.: Vergleich der Ferricyanid-Reduktase-Aktivität der in verschiedenen Bakterienstämmen überexprimierten rAt-SOX.** Aus 50 ml-Expressionskulturen der verschiedenen Bakterienstämme, die mit dem pQE-80-rAt-sox transformiert waren, wurde durch Sonifikation die lösliche Proteinfraction extrahiert und anschließend im Ferricyanid-Assay eingesetzt. Durch Zugabe von jeweils 20 µg Proteinextrakt zum Reaktionsansatz wurde die Reduktion des Ferricyanids initiiert und bei 420 nm die Absorptionsabnahme verfolgt. Die höchste erhaltene Anfangssteigung im Ferricyanid-Assay bei im TP1000 exprimierten rAt-SOX-Protein wurde auf 100% festgesetzt und die anderen ermittelten Aktivitäten darauf bezogen.

Parallel zu den Messungen der mit pQE-80-At-sox transformierten Bakterienstämme wurden auch die Proteinextrakte der nicht-transformierten Stämme auf ihre SOX-Aktivität über die Sulfit-abhängige Ferricyanid-Reduktion untersucht. Dabei zeigte sich eine Sulfit-

unabhängige Reduktion von Ferricyanid, die zwischen 10-15% zur höchsten gemessenen SOX-Aktivität betrug (Abb. 2.8).

Aus diesen expressionskinetischen Daten resultierend, wurde die rAt-SOX im *E. coli*-Stamm TP1000 für 24 h bei RT exprimiert. Die Zelldichte bei der Induktion durch IPTG lag unter  $OD_{600} = 0,1$ . Die Induktion wurde durch eine Konzentration von 0,1 mM IPTG initiiert. Dem Kulturmedium wurde zusätzlich Molybdän in einer Konzentration von 0,5 mM zugesetzt, da es durch die starke Akkumulation an MPT im TP1000-Stamm zu einer Rekonstitution von Molybdänkofaktor kommt, welcher dann in das überexprimierte Protein inseriert werden kann.

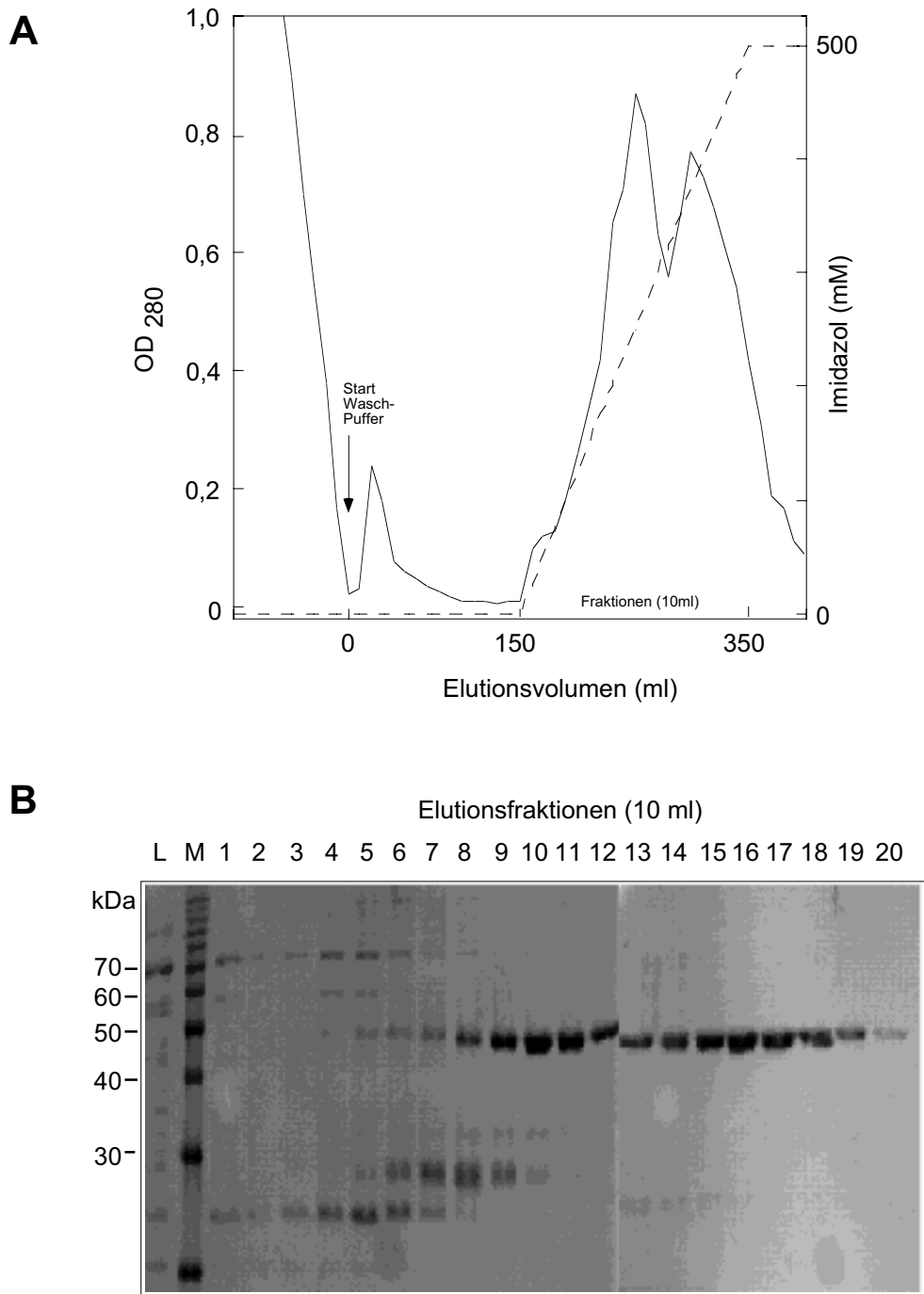
#### **2.2.2.2 Modifikationen der Zellyse-Bedingungen**

Eine Extraktion mit reduzierenden Zusätzen, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol im Lysis-Puffer, zeigte keinen Einfluß auf Extrahierbarkeit und Löslichkeit der rAt-SOX (Daten nicht gezeigt). Dem Lysis-Puffer wurde zur Verringerung der unspezifischen Bindung von kontaminierenden Proteinen des Zell-Lysats an Ni-NTA Imidazol in einer Konzentration von 20 mM zugesetzt.

Die parallele Anwendung der mechanischen („French-Press“ und Ultraschall) und enzymatischen (Lysozym) Proteinextraktions-Methoden zeigte eine gute Extraktion des Proteins aus *E. coli*. Die Verwendung von frisch geernteten Bakterienkulturen bzw. zuvor bei  $-70^{\circ}\text{C}$  zwischengelagerten Bakterienpellets zeigte keinen signifikanten Einfluß.

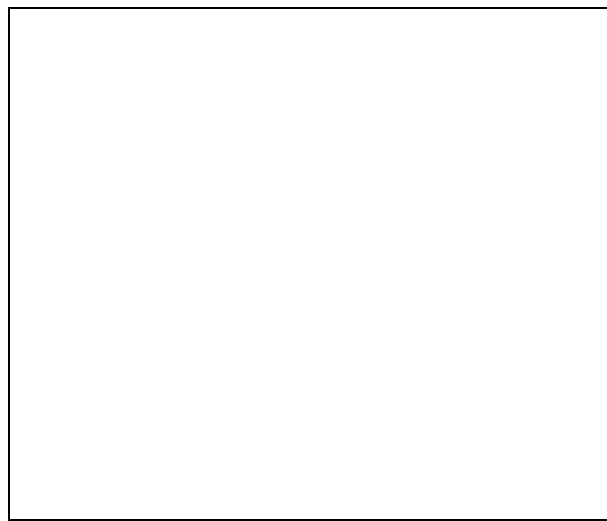
### 2.2.2.3 Affinitätschromatographische Reinigung der rAt-SOX an Ni-NTA

Die im prokaryotischen *E. coli*-Expressionssystem exprimierte rAt-SOX wurde präparativ durch Metallaffinitätschromatographie gereinigt. Dabei bindet die, an das Protein angeheftete sechs Aminosäuren lange, Histidin-Markierung spezifisch an eine Nickel-Matrix. Die Bindung kann durch den Kompetitor Imidazol getrennt werden und das Protein so wieder von der Matrix eluieren. Bei den durchgeführten Reinigungen am GradiFrac (AP Biotech, Freiburg) mit einer Elution des Proteins durch einen 10 Säulenvolumen umfassenden Imidazol-Gradienten (20–500 mM), konnte eine Reinheit von mehr als 95% erreicht werden (Abb.2.9). Die rAt-SOX eluierte in einem sehr weiten Imidazol-Konzentrationsbereich von 150 bis 500 mM von der Säule. Dabei war festzustellen, dass bei einer großen gebundenen Menge an rAt-SOX-Protein zwei At-SOX-enthaltene Fraktionen getrennt voneinander eluierten (Abb.2.9). Vermutlich handelte es sich bei der ersten Fraktion um rAt-SOX-Protein, welches sich an bereits an der Ni-NTA-Matrix gebundenes Protein, angeheftet hatte. Dies war ein erster Hinweis auf eine mögliche Dimerisierung des Proteins, die bei vorliegender hoher Proteinkonzentration durch die Bindung eines Partners an die Ni-NTA-Matrix nicht beeinträchtigt wurde. Bei steigender Imidazolkonzentration kam es dann zunächst, durch Veränderung der Salzkonzentration, zur Elution dieses Proteinpools und später, durch Konkurrenz des Imidazol mit dem Histidin, zur Elution des zweiten Proteinpools. Die nach der Affinitätschromatographie analysierten rAt-SOX enthaltenden Fraktionen wurden dialysiert und ankonzentriert. Es konnte eine Proteinausbeute von 3,4-4,2 mg/Liter Expressionskultur erreicht werden.



**Abb.2.9: Affinitätschromatographische Reinigung der rAt-SOX an Ni-NTA-Superflow-Matrix in einer Chromatographie-Säule.** (A) Chromatogramm der Reinigung der rAt-SOX aus 8 l Expressionskultur (25°C, 24 h) an 15 ml Ni-NTA-Superflow-Matrix. Nach dem Laden des Lysats wurde die Säule mit 350 ml Lysispuffer und 150 ml Wasch-Puffer (1 ml/min) gewaschen. An die Säule gebundenes rAt-SOX-Protein wurde mit 200 ml eines linearen Imidazol-Gradienten (20-500 mM) in Wasch-Puffer eluiert und in 10 ml-Fraktionen aliquotiert. (B) SDS-PAGE-Analyse von je 20 µl der Eluat-Fraktionen nach Coomassie-Blau-Färbung. M: 10 kDa Standard-Proteine, L: Bakterienzellysat.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden auch Reinigungen im „Batch“-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurde die Ni-NTA-Matrix nicht in Säulen gepackt, sondern die gesamte Reinigung in einem Becherglas vollzogen. Ein Wechsel der Lösungen wurde durch vorsichtiges Dekantieren und anschließendes Resuspendieren im zweifachen Matrixvolumen gewährleistet. Bei vergleichbaren Proteinausbeuten von 2,9-4,3 mg/Liter Expressionskultur lag die Reinheit der eluierten rAt-SOX hier nur bei etwa 80% (Abb. 2.10).



**Abb.2.10: Affinitätschromatographische Reinigung der rAt-SOX an Ni-NTA-Superflow-Matrix im „Batch“-Verfahren.** SDS-PAGE-Analyse von je 20 µl der Eluat-Fractionen nach Coomassie-Blau-Färbung. M: 10 kDa Standard-Proteine.

Im Gegensatz zur Reinigung der rAt-SOX über eine Ni-NTA-Säule, bei der kontaminierende Proteine während des Imidazol-Gradienten abgetrennt werden konnten, war diese Reinheit bei der Aufarbeitung im „Batch“-Verfahren nicht zu erreichen. Interessanterweise konnte in dem Eluat der „Batch“-Reinigung eine deutliche Sulfid-abhängige Cytochrom c-Reduktase Aktivität beobachtet werden. Da die ausschließlich aus einer Moco-Domäne bestehende rAt-SOX zu einer solchen Enzymaktivität nicht befähigt ist, konnte von einer Interaktion mit einem *E. coli* Häm-Protein ausgegangen werden. Dies

war ein erster experimenteller Hinweis auf eine mögliche Interaktion der At-SOX mit einem Häm-Protein. Eine solche Koreinigung konnte während der Reinigung mittels eines Imidazol-Gradienten nicht beobachtet werden. Die eluierte Proteinfraction zeigte keine Cytochrom c-Reduktase-Aktivität, allerdings konnte eine Sulfid-abhängige Enzymaktivität durch Ferricyanid gemessen werden.

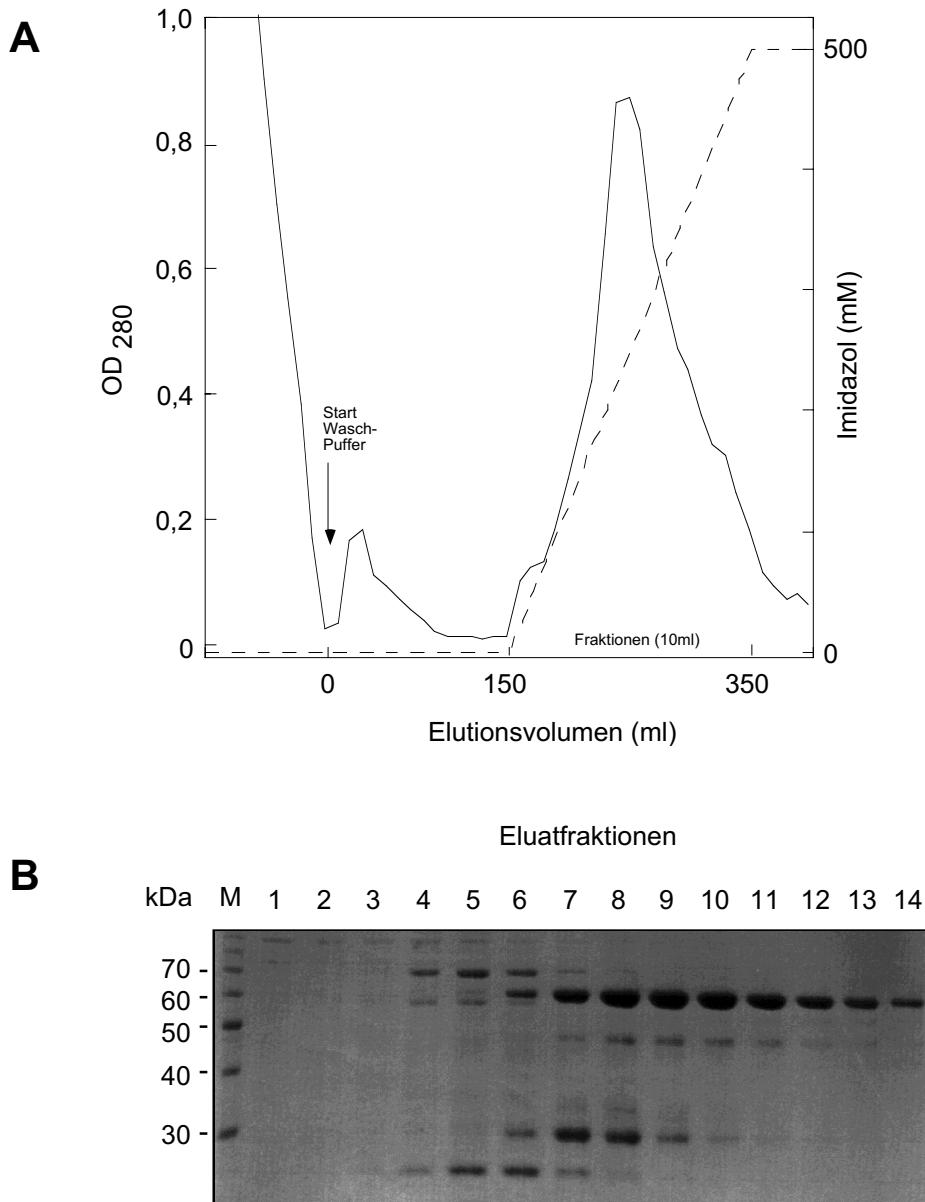
### **2.3 Klonierung einer SOX aus *Mus musculus* und chromatographische Reinigung des rekombinant exprimierten SOX-Proteins (rMm-SOX)**

Die Klonierung, Überexpression und Reinigung einer Säuger-SOX sollte durchgeführt werden, um diese spektroskopisch (UV/vis und EPR) und enzymkinetisch mit der pflanzlichen SOX vergleichen zu können.

Für die PCR-Amplifikation mit degenerierten Primern aus *R. norvegicus* wurde eine zur Verfügung stehende cDNA-Bank aus *Mus musculus* genutzt. Das 1,5 kB große Amplifikat wurde durch die generierten *Nco*I- und *Bgl*II-Restriktionsschnittstellen in den pQE-60-Vektor kloniert (pQE-60-Mm-sox). In Anlehnung an die rAt-SOX Klonierung und Reinigung (Kap. 2.2.) wurde auch hier später zur Verbesserung der Enzymausbeuten eine Klonierung in den pQE-80-Vektor (pQE-80-Mm-sox) durchgeführt.

Bei den Expressionsbedingungen und den Aufarbeitungen des Zellysates wurde sich an den erzielten Ergebnissen der rAt-SOX-Reinigung orientiert. In Abb. 2.11 sind die Ni-NTA-Eluatfraktionen der rMm-SOX-Reinigung in einer Coomassie-Blau-Färbung analysiert. Die Expression und die Elution der rMm-SOX konnte durch die Rotfärbung des Proteins im Gegensatz zur rAt-SOX kontrolliert und verfolgt werden. Diese Färbung ist ein Indiz für das Vorhandensein eines gebundenen Eisenatoms innerhalb einer Hämgruppe.

Bei einer Reinheit von 95% konnte eine Proteinausbeute von 4,3-5,7 mg/Liter Expressionskultur erreicht werden. Die dialysierten und ankonzentrierten rMm-SOX-enthaltenden Fraktionen wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert und nach Bedarf aufgetaut.



**Abb.2.11: Affinitätschromatographische Reinigung der rMm-SOX an Ni-NTA-Superflow-Matrix in einer Chromatographie-Säule.** (A) Chromatogramm der Reinigung der rMm-SOX aus 5 l Expressionskultur ( $25^{\circ}\text{C}$ , 24 h) an 10 ml Ni-NTA-Superflow-Matrix. Nach dem Laden des Lysats wurde die Säule mit 200 ml Lysispuffer und 150 ml Wasch-Puffer (1 ml/min) gewaschen. An die Säule gebundenes rMm-SOX-Protein wurde mit 200 ml eines linearen Imidazol-Puffers eluiert und in 10 ml-Fractionen aliquotiert. (B) Gradienten (20-500 mM) in SDS-PAGE-Analyse von je 20  $\mu\text{l}$  der Eluat-Fractionen nach Coomassie-Blau-Färbung. M: 10 kDa Standard-Proteine.

## 2.4 Erzeugung und Charakterisierung von Punktmutanten der rAt-SOX

Durch frühere Arbeiten (Johnson & Rajagopalan, (1976); Pacheco & Enemark, (1999); Brody & Hille, (1999)) war die Biochemie der tierischen SOXs (*Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*) gut charakterisiert. Für ein besseres Verständnis der Biochemie der pflanzlichen SOX wurde die rAt-SOX-Aminosäuresequenz in Anlehnung an diese Arbeiten punktmutiert und die erhaltenen veränderten rAt-SOX's nach der Reinigung auf ihren MPT-Gehalt und die SOX-Aktivität untersucht. Ziel dieser Mutationseinführungen war ein eventuell verändertes enzymatisches Verhalten, aus dem auf die katalytischen Eigenschaften geschlussfolgert werden konnte. Diese Veränderung sollte zum einen durch das Mutieren einer den Molybdäncofaktor bindenden Aminosäure und zum anderen durch den Austausch einer Aminosäure, die einen Einfluß auf die Bindung des Produktes bzw. Substrates (Sulfat/Sulfit) hat, erreicht werden. Für das an Position 98 lokalisierte Cystein ist eine Bindung des Molybdäncofaktors über eine S-Bindung bewiesen (Kisker, 1997). Garrett & Rajagopalan beschrieben 1996 eine humane SOX-Mutante, die genau in diesem Cystein (Pos. 207) mutiert ist. Die Aminosäure Cystein an Position 98 der rAt-SOX-Proteinsequenz wurde daraufhin zu einem Alanin ausgetauscht.

In Anlehnung der Arbeiten von Garrett & Rajagopalan (1998), die eine humane SOX-Mutante beschrieben, in der die Aminosäure Arginin (Pos. 160) zu einem Glutamin ausgetauscht war, wurde das sich in der pflanzlichen SOX-Sequenz an Position 55 befindliche Arginin ebenfalls zu einem Glutamin mutagenisiert. Das Arginin ist in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert, und ihm wird ein Einfluß auf die Bindung von Sulfit/Sulfat zugesprochen (Pacheco & Enemark, 1999).

Bei dem Aminosäure-Austausch Glutaminsäure (E) zu Methionin (M) an Position 192 sollte eine Modifizierung der rAt-SOX hin zur Nitratreduktase des gleichen Organismus



durchgeführt werden. Die mutagenisierten rAt-SOX's wurden im folgenden R55Q-rAt-SOX, C98A-rAt-SOX und E192M-rAt-SOX genannt.

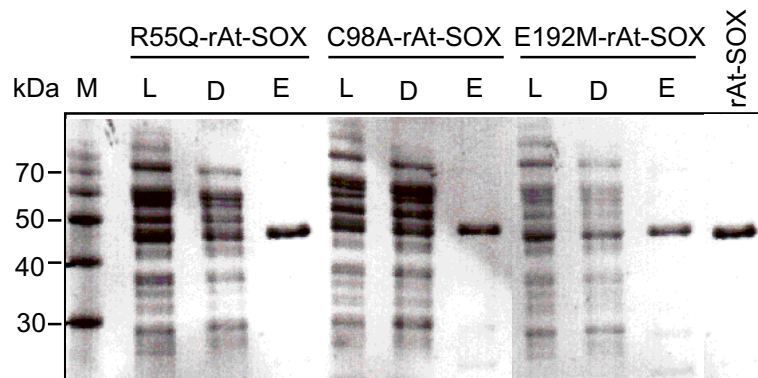
#### **2.4.1 Erzeugung von mutagenisierten rAt-SOX-Proteinen**

Die einzelnen Punktmutationen wurden durch mutagenisierende Oligonukleotide mittels PCR-Amplifikation in die Sequenz eingefügt. Als DNA-Template wurde der Expressionsvektor pQE-80-*At-sox* verwendet. Im Anschluß an die Amplifikation des gesamten punktmutierten Vektors wurde der Ansatz einem *DpnI*-Verdau unterzogen. Durch diesen Verdau wurde der methylierte *E. coli*-Matrizenvektor (pQE-80-*At-sox*) selektiv aus dem Ansatz entfernt. Bei der anschließenden Transformation in einen Amplifikationsstamm wurden die jeweiligen Vektoren durch eine Sequenzierung auf die eingefügten Mutationen hin kontrolliert.

#### **2.4.2 Expression und Reinigung von punktmutierten At-SOX-Proteinen**

Die mutagenisierten Vektoren wurden in dem *E. coli*-Stamm TP1000 zur Expression der veränderten rAt-SOX's genutzt. Die Expression der mutagenisierten Proteine erfolgte in einer 200 ml-Expressionskultur, und die Reinigung wurde in Tropfsäulen mit einem Ni-NTA-Matrixvolumen von 1 ml durchgeführt. Die Reinigung wurde durch die Überprüfung der Eluatfraktionen durch eine SDS-PAGE und anschließende Proteinfärbung mittels Coomassie-Blau analysiert. Sowohl die Reinheit, als auch die Proteinmenge der gereinigten mutierten rAt-SOXs, war hierbei mit dem nicht-mutierten rAt-SOX-Protein vergleichbar (Abb.2.12). Die Einführung der Punktmutationen wiesen keinen strukturellen Einfluß auf

die überexprimierten Proteine auf, was an den vergleichbaren Mengen an exprimiertem und gereinigtem Protein erkannt werden konnte.



**Abb.2.12: Expressionsvergleich der mutierten rAt-SOX's.** SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der punktmutierten rAt-SOX's aus je 200 ml Expressionskultur im TP1000. Analysiert wurden 20 µl des löslichen Proteinlysats (L), des Säulendurchbruchs (D) während der Waschung mit Wasch-Puffer und der 2 ml-Eluatfraktion (E) durch 500 mM Imidazol im Wasch-Puffer nach Coomassie-Blau-Färbung. M: 10 kDa Standard-Proteine.

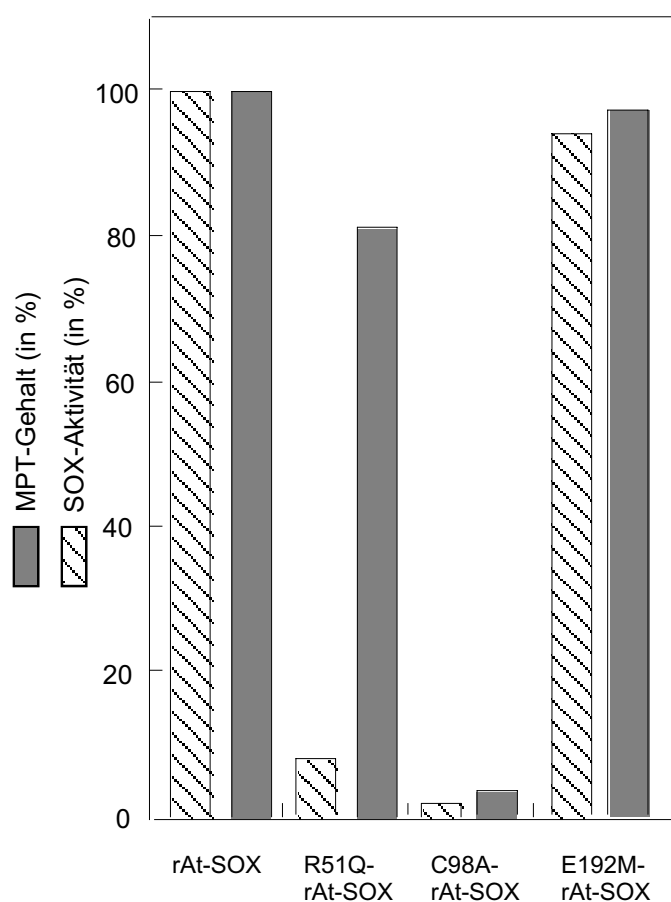
### 2.4.3 Funktionelle Charakterisierung der mutierten rAt-SOX-Proteine:

#### Bestimmung des MPT-Gehaltes und der SOX-Aktivität

Die Generierung punktmutierter rAt-SOX's hatte das Ziel, die veränderten Proteine auf ihre enzymatische Aktivität hin zu untersuchen. Hierfür wurden gleiche Mengen der gereinigten Proteine auf ihren MPT-Gehalt und ihre SOX-Aktivität näher untersucht. Bei diesem Vergleich wurden die Daten der Wildtyp-rAt-SOX auf 100% gesetzt.

Im Unterschied zu den Aminosäureaustauschen an den Positionen R55Q (80% MPT-Gehalt) und E192M (93% MPT-Gehalt), lag der MPT-Gehalt bei der C98A-Mutante bei 3% (Abb. 2.13). Die Mutationen hatten neben dem Einfluß auf die MPT-Bindung auch Auswirkungen auf die SOX-Aktivität. So ging die Aktivität bei den R51Q- und C98A-Mutanten stark zurück und lag unter 10% im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 2.13).

Der Aminosäureaustausch an der Position 192 von E zu M zeigte hingegen keinen deutlichen Einfluß auf die SOX-Aktivität und lag bei ca. 90%. Der Aminosäureaustausch eines Cysteins zu einem Alanin an Position 98 hat demnach auch für die pflanzliche SOX drastische Folgen für die Bindung des Molybdäncofaktors. Durch die starke Reduzierung der Bindekapazität des Molybdäncofaktors in diesem mutierten Protein ist auch die SOX-Aktivität stark herabgesetzt. Im Gegensatz hierzu ist die ebenfalls zu beobachtende Verminderung der SOX-Aktivität bei dem Austausch der Aminosäure Arginin gegen ein Glutamin nicht auf den Verlust der Molybdäncofaktorbindung zurückzuführen, sondern könnte mit der Bindung des Substrates Sulfit bzw. des Produktes Sulfat in Verbindung gebracht werden.



**Abb. 2.13: Vergleich der SOX-Aktivität und des MPT-Gehaltes in den punkt-mutierten rAt-SOX's.** Die Enzymaktivität (Ferricyanid-Reduktase) und der MPT-Gehalt des nicht modifizierten rAt-SOX-Proteins wurde auf 100 % festgesetzt und die anderen Werte darauf bezogen (100%-Aktivität = 0,09  $\mu$ mol Sulfit/min).

Die mit den beiden mutagenisierten rAt-SOX's (R51Q- und C98A-Mutante) erbrachten funktionellen Daten zeigen deutliche Übereinstimmungen mit den bereits durch die SOX aus Säugern bekannten Daten. Der Austausch der Aminosäure Glutamat zu Methionin (E192M-Mutante) ergab dagegen in den durchgeführten funktionellen Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur rAt-SOX. Der Austausch der Aminosäure Glutaminsäure der At-SOX in ein für die Nitratreduktase aus *A. thaliana* konserviertes Methionin, zeigte weder ein verändertes enzymatisches Verhalten noch eine modifizierte Affinität zum Molybdänkofaktor.

## **2.5 Charakterisierung von *N. plumbaginifolia* *cnx*-Mutanten bezüglich ihrer SOX-Expression und SOX-Aktivität**

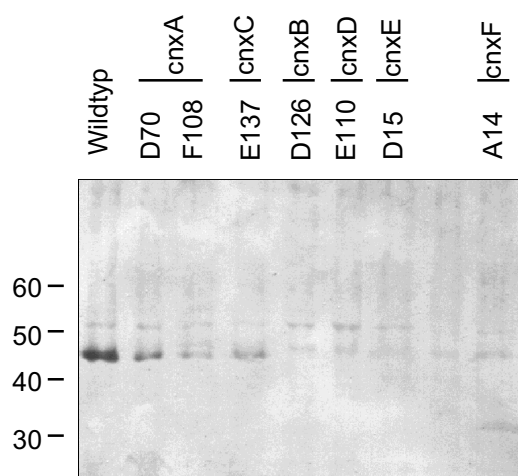
Eine Mutation in der Biosynthese des Moco bei Pflanzen führt zum pleiotropen Verlust aller Molybdoenzym-Aktivitäten. Solche Mutanten können durch Zugabe von reduzierten Stickstoff-Quellen im Medium kultiviert werden. Dieser Sachverhalt weist auf eine dominante Bedeutung der Nitratreduktase hin. Im folgenden Kapitel soll die Expression der SOX in Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen von *N. plumbaginifolia* untersucht werden. Weiterhin wurden in den Proteinrohextrakten der Mutanten die Sulfit-abhängige Ferricyanid-Reduktase-Aktivität gemessen und mit der SOX-Aktivität in Wildtyp-Pflanzenextrakt verglichen.

Die in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Moco-Mutanten aus *N. plumbaginifolia* wurden durch chemische Mutagenese und anschließende Chloratselektion durch Gabard *et al.*, (1987) isoliert und genetisch klassifiziert. Neben den *nia*-Mutanten, die einen Defekt in dem Apoprotein der Nitratreduktase aufwiesen, konnten auch mehrere *cnx*-Mutanten (*cnxA* = D70, F108; *cnxB* = D126; *cnxC* = E137; *cnxD* = E110; *cnxE* = D15 und *cnxF* = A14)

biochemisch teilcharakterisiert werden. Die auffälligsten Mutanten gehörten zum *cnxA*-Locus (D70 und F108). Diese Mutanten zeichnen sich durch eine Molybdat-Reparierbarkeit und eine Rekonstitution im *nit-1*-Enzym-Assay aus. Durch Schwarz (2000) wurden die Moco-Mutanten auf ihren MPT-Gehalt getestet. Das Dimerisierungsverhalten der Nitratreduktase wurde durch Poll *et al.*, 1991 und Mendel *et al.*, 1986 näher untersucht. Mendel *et al.*, 1985 wiesen eine MPT-Abhängigkeit der Dimerisierung der NR in *N. plumbaginifolia* nach.

### 2.5.1 Expressionsanalyse der SOX in *N. plumbaginifolia* *cnx*-Mutanten

Zunächst sollte durch eine Expressionsanalyse mittels immunologischen Nachweises der Gehalt an exprimiertem endogenen SOX-Protein in den *N. plumbaginifolia* *cnx*-Mutanten deutlich gemacht werden. Hierzu wurde nicht-grünes Kallus-Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Proteine durch Mörsern extrahiert. Die pflanzlichen Rohextrakte wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und immunologisch analysiert.



**Abb. 2.14.: Immunologischer Nachweis des endogenen SOX-Proteins in *Nicotiana plumbaginifolia* im Wildtyp und in Moco-Biosynthese-Mutanten.** Es wurden 20 µg Protein des jeweiligen pflanzlichen Zelllysates in einem 12,5%-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit den polyklonalen Antikörpern gegen die rAt-SOX immunologisch analysiert.

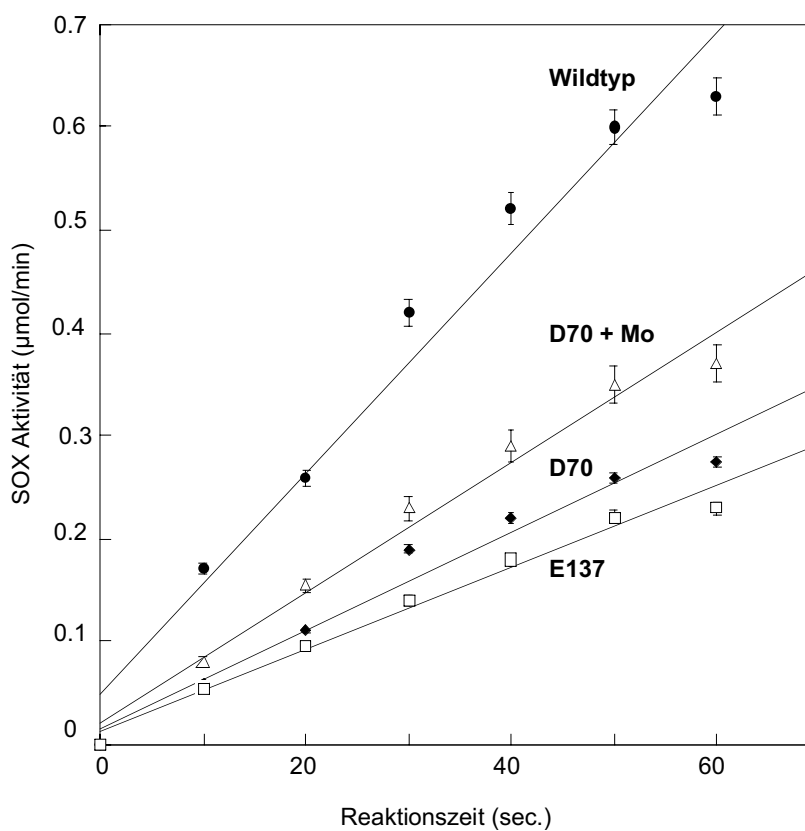
Im Vergleich zum Wildtyp-Pflanzenextrakt zeigten alle untersuchten Pflanzenextrakte der Moco-Mutanten eine deutlich verringerte Menge an At-SOX im Extrakt (Abb. 2.14). In den *cnxA*-Mutanten D70 und F108, der *cnxC*-Mutante E137 und in der *cnxF*-Mutante A14 konnte jedoch eine deutliche Menge an SOX-Protein immunologisch nachgewiesen werden. Die FormA-Analyse (Schwarz, 1997) ergab in diesen Mutanten eine signifikante Menge an FormA bzw. MPT (zwischen 4,5-7,5 pmol MPT/mg Protein). Die ebenfalls getesteten Mutanten der Loci *cnxB* (D126), *cnxD* (E110) und *cnxE* (D15) hatten keinen nachweisbaren Gehalt an MPT und zeigten auch in der immunologischen Analyse der SOX keinen hohen Gehalt an Protein.

### 2.5.2 Rekonstitution der SOX-Aktivität bei *N. plumbaginifolia* *cnx*-Mutanten

Neben der Expressionsanalyse wurde auch die SOX-Aktivität (Sulfit-abhängige Ferricyanid-Reduktase) in den Proteinextrakten der *N. plumbaginifolia* *cnx*-Mutanten vermessen. Die Mutanten sind durch den Verlust der Aktivität aller Molybdoenzyme (Nitratreduktase, Xanthindehydrogenase und Aldehydoxidase) charakterisiert. In diesen Moco-defizienten Mutanten sollte keine SOX-Aktivität messbar sein, wenn die pflanzliche SOX das einzige Enzym mit Sulfit-oxidierender Wirkung sein sollte.

Im Vergleich zur SOX-Aktivität in Proteinrohextrakten aus *N. plumbaginifolia* Wildtyp-Kallus konnte in den Mutanten der *cnx*-Loci *cnxA* (D70) und *cnxE* (D15) eine auf  $39 \pm 6\%$  verringerte Aktivität gemessen werden (Abb. 2.15). Mutanten des *cnxA*-Locus sind als Molybdat-reparierbar beschrieben (Mendel *et al.*, 1981) und besitzen einen deutlichen Gehalt an MPT (Schwarz *et al.*, 2000). Ihnen wird ein Defekt in der Insertion des Molybdatos in das MPT zugesprochen. Die fehlende Insertase-Aktivität kann durch die Präsenz höherer Konzentrationen an Molybdat im Kulturmedium kompensiert werden.

Tatsächlich zeigte die *cnxA*-Mutante D70 bei der Anzucht mit 1 mM Molybdat im Kulturmedium eine deutliche Erhöhung der SOX-Aktivität auf  $65 \pm 8\%$  zur Wildtyp-Aktivität (Abb. 2.15). So konnte durch den Einsatz der *N. plumbaginifolia* *cnx*-Mutanten ein direkter Zusammenhang zwischen der gemessenen SOX-Aktivität und dem At-SOX-Enzym hergestellt werden. In etwa 60% der beobachteten SOX-Aktivität in Wildtyp-Pflanzen kann auf die Sulfid-oxidierende Wirkung der pflanzlichen SOX zurückgeführt werden. Die Natur der restlichen 40% SOX-Aktivität ist unklar.



**Abb. 2.15: Vergleich der SOX-Aktivität im Wildtyp von *N. plumbaginifolia* zu Moco-Biosynthesemutanten.** Jeweils 20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurde für die Messung der Ferricyanid-Reduktase-Aktivität eingesetzt und der Umsatz an Sulfid/min berechnet. D70 = *cnxA*-Loci, D15 = *cnxE*-Loci, D70 + Mo = Kultur mit 1 mM Molybdat im Kulturmedium während der Anzucht.

## 2.6 Reinigung der nativen SOX aus *Nicotiana tabacum* (Nt-SOX)

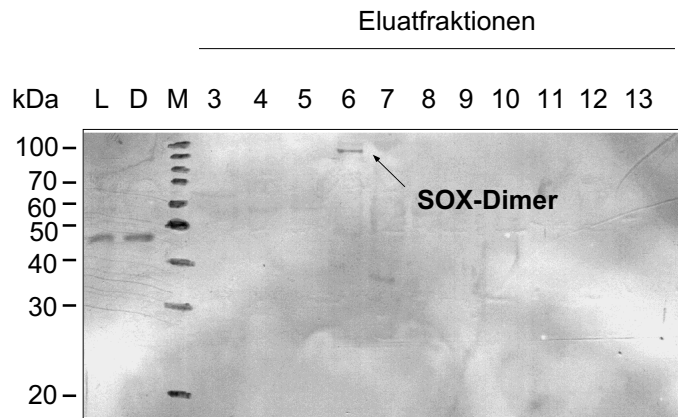
Als weiterer Beweis für die Existenz einer SOX in Pflanzen sollte dieses Enzym aus Pflanzenmaterial nativ gereinigt werden. Zur Detektion des Enzyms wurden die Reinigungsfractionen mit dem zur Verfügung stehenden Antikörper, welcher gegen die rekombinante At-SOX gerichtet ist, immunologisch analysiert. Aufgrund der größeren Menge an zur Verfügung stehenden Pflanzenmaterials wurde zur Reinigung grünes Blattmaterial von *N. tabacum* verwendet. Im Gegensatz dazu ergab die Extraktion aus Suspensionskulturen von *N. plumbaginifolia* nur etwa ein Drittel an gereinigtem Enzym. Aus 16 g Blattmaterial von *N. tabacum* konnten insgesamt 335 mg Gesamtprotein extrahiert werden. Nach Messung der Enzymaktivität mittels Ferricyanid wurde eine Gesamtaktivität des Rohextraktes von 2317 U und eine spezifische Aktivität von 6,91 U/mg Gesamtprotein ermittelt.

### 2.6.1 Anreicherung der Nt-SOX mittels Anionenaustauscher-Chromatographie

Als erster Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustauscher-Matrix (SourceQ30, AP Biotech, Freiburg) verwendet. Der Vorteil dieser Reinigungsmethode liegt in der effektiven Konzentrierung des zu reinigenden Proteins in einem relativ geringen Elutionsvolumen. Die immunologische Analyse der Fraktionen ergab eine Elution der Nt-SOX, sowohl im Durchfluß der Säule, als auch in einem engen Elutionsbereich durch den angelegten Salzgradienten zwischen 200–250 mM NaCl (Abb. 2.16) in der Eluatfraktion 6. Bei dem Antikörper-Signal der Eluatfraktion handelte es sich um die Dimerform der Nt-SOX mit



einem  $M_r$  von ca. 90 kDa. Im Gegensatz dazu konnte das Antikörpersignal im Durchfluß mit einer Größe von etwa 45 kDa detektiert werden, was der Monomerform entspricht.



**Abb. 2.16: Immunologische Analyse der Reinigung der nativen Nt-SOX über eine Anionenaustauscher-Chromatographie (SourceQ 30-Matrix).** Analysiert wurden jeweils 20  $\mu$ l des pflanzlichen Zellsates (L), des Säulendurchbruchs (D) und die Eluatfraktionen (7,5 ml). M: 10 kDa Standard-Proteine.

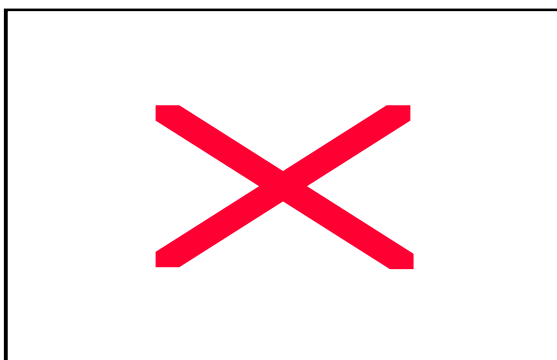
Eine mit den Antikörpersignalen korrespondierende Enzymaktivität konnte nur für die Eluatfraktion gemessen werden, nicht aber für die Durchflußfraktion. Eine mögliche Erklärung wäre der teilweise Verlust des Molybdäncofaktors während der Reinigung. Dies hätte den Verlust der SOX-Aktivität zur Folge und könnte auch entscheidenden Anteil an einem veränderten Bindungsverhalten an die SourceQ30-Matrix haben.

Zur weiteren Reinigung wurde ausschließlich die aktive Eluatfraktion weiterverwendet. Die Messung der Proteinkonzentration ergab eine absolute Proteinmenge von 16,7 mg mit einer totalen Aktivität von 1004 U. Bei einer spezifischen Aktivität von 60,12 U/mg Protein wurde ein Reinigungsfaktor von 8,70 erreicht. Der prozentuale Anteil der gereinigten Aktivität konnte mit 43,30% im Vergleich zur Ausgangsaktivität des Rohextraktes errechnet werden. Die das Enzym enthaltende 10 ml-Eluatfraktion wurde für den nächsten Reinigungsschritt auf insgesamt 1 ml konzentriert.

### 2.6.2 Anreicherung der Nt-SOX mittels Gelfiltration

Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine Molekulargewicht-separierende Gelfiltration gewählt. Bei einem maximalen Auftragsvolumen von 200 µl waren insgesamt 5 Gelfiltrationsläufe zur Aufreinigung des aus dem ersten Reinigungsschritt erhaltenen Proteins notwendig. Diese Läufe wiesen in ihrem Elutionsprofil eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Die native Nt-SOX konnte in einem Elutionsbereich zwischen 13,50–15,50 ml immunologisch detektiert werden (Abb. 2.17). Desweiteren konnte eine korrespondierende Ferricyanid-Reduktase-Aktivität in diesem Bereich gemessen werden. Die erhaltenen 10 ml Proteinlösung (5 x 2ml) wurden wiederum auf 1 ml konzentriert und genauer untersucht. Bei einer Proteinmenge von insgesamt 0,32 mg konnte eine Gesamtaktivität von 247 U und eine spezifische Aktivität von 771,88 U/mg Protein ermittelt werden. Dies ergab einen Anreicherungsfaktor von 12,84 und eine Ausbeute von 10,70%.

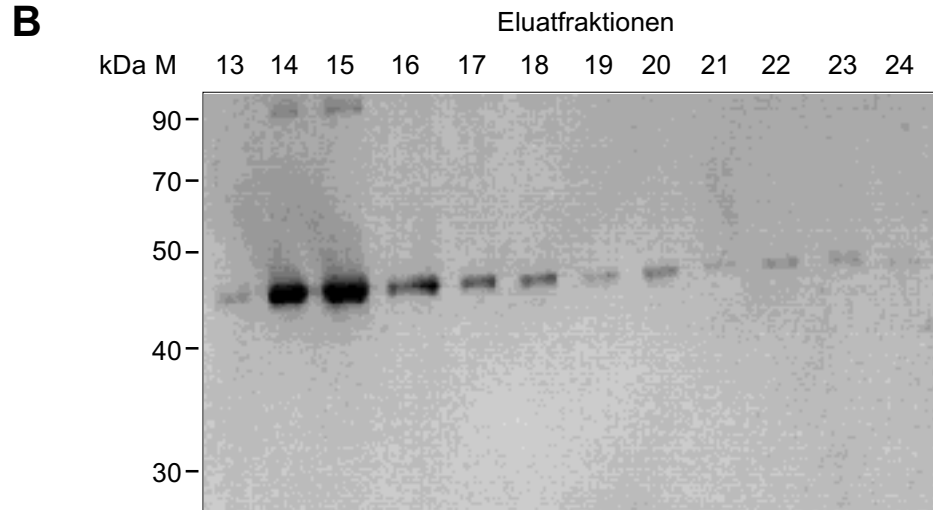
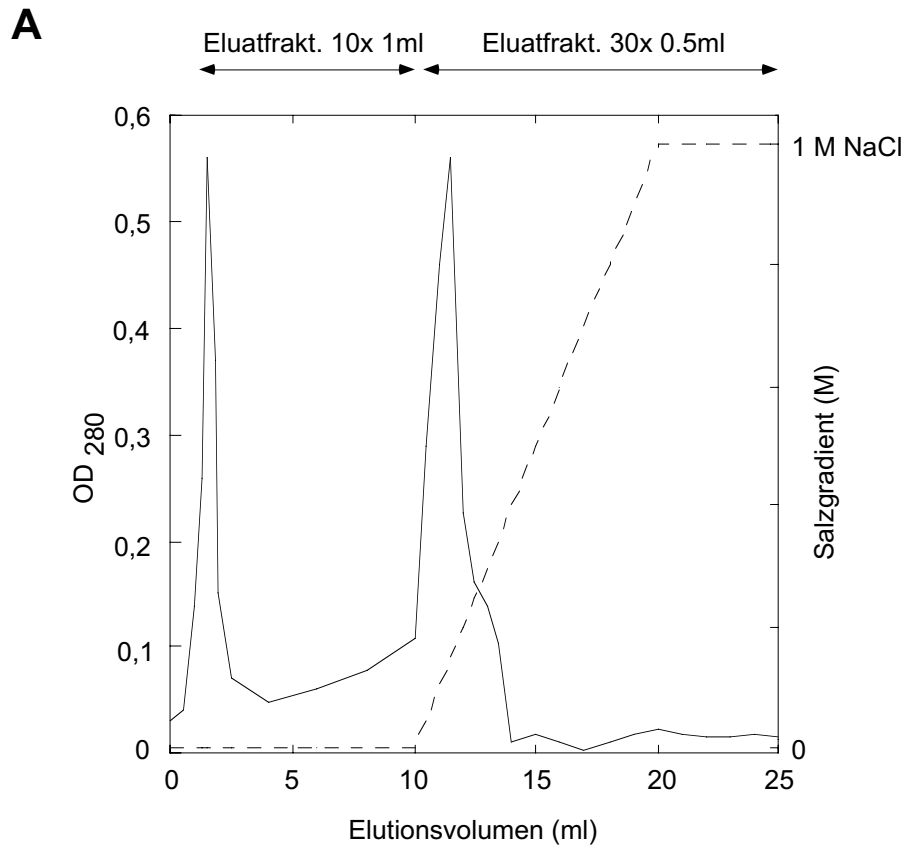
Eine Analyse der einzelnen Anreicherungsschritte der Nt-SOX im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel zeigte, dass die native Nt-SOX bereits nach dem zweiten Reinigungsschritt in einer Reinheit von etwa 95% vorlag.



**Abb. 2.17: Immunologische Analyse der Reinigung der nativen Nt-SOX über eine Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex 200-Matrix).** Analysiert wurden jeweils 20 µl der Eluatfraktionen (0,5 ml). M: 10 kDa Standard-Proteine. Die polyklonalen Antikörper gegen die rAt-SOX wurden in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt

### **2.6.3            Abtrennung von Verunreinigungen der Nt-SOX mittels Anionenaustauscher-Chromatographie**

Zur Abtrennung letzter Verunreinigungen der Nt-SOX wurde nochmals eine Anionenaustauscher-Matrix (Bioscale Q1, BioRad) bei einem pH-Wert von 8,0 verwendet. Bei dieser Matrix handelt es sich um Protein-auftrennendes Material, welches in einer vorgepackten Säule im Volumen von 1 ml vorliegt. Die gesamte konzentrierte Proteinlösung wurde innerhalb einer Chromatographie aufgetrennt. Bereits bei der Verfolgung der Proteinelution durch Messung der OD bei 280 nm konnten zwei dominante Peaks beobachtet werden (Abb. 2.18). Mit einem Anteil von 70% zum Gesamtproteingehalt eluierte Protein bereits im Durchfluß während der Beladung mit der Proteinlösung. Bei der anschließenden Elution durch einen linearen Salzgradienten eluierten die an die Matrix gebundenen restlichen 30% Protein. Eine Vermessung der Fraktionen durch den Ferricyanid-Assay ergab einzig in den Eluatfraktionen 14, 15 und 16 eine meßbare Ferricyanid-Reduktase-Aktivität. Im Durchfluß (Fraktion 1) konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Im immunologischen Nachweis wurden positive Antikörpersignale im Durchfluß und in den Eluatfraktionen detektiert. Eine mögliche Erklärung für den Verlust der SOX-Aktivität kann auch hier, wie bereits in Kapitel 2.5.1. beschrieben, der Verlust des Molybdäncofaktors während der Reinigung sein. Das unterschiedliche Bindungsverhalten an die Austauschermatrix kann ebenfalls auf den Verlust des Cofaktors zurückzuführen sein. Protein, welches den Cofaktor bindet und so eine andere Konformation einnimmt, bindet an die Matrix und es kann nach erfolgter Elution SOX-Aktivität in diesem Enzympool nachgewiesen werden.



**Abb. 2.18: Anionenaustauscher-Chromatographie der Nt-SOX an einer Bioscale Q1-Säule:**

(A) Chromatogramm der Reinigung der Nt-SOX. Nach dem Laden des Proteins bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde nach 10 Säulenvolumen ein Gradient von 0-1 M NaCl angelegt, um die an die Matrix gebundenen Proteine zu eluieren. (B) Immunologische Analyse der Eluatfraktionen von der Anionenaustauscher-Chromatographie (Bioscale Q1, BioRad). Analysiert wurden jeweils 20 µl der Eluatfraktionen (0,5 ml). M: 10 kDa Standard-Proteine. Die polyklonalen Antikörper gegen die rAt-SOX wurden in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt

#### 2.6.4 N-terminale Sequenzierung der gereinigten Nt-SOX

Eine N-terminale Proteinsequenzierung des aufgereinigten Proteins mit Ferricyanid-Reduktase-Aktivität sollte bestätigen, dass es sich bei diesem Protein um eine SOX handelte.

Die gereinigte native putative Nt-SOX wurde auf PVDF-Membran geblottet und N-terminal ansequenziert. Dabei konnte die Sequenz der ersten 14 Aminosäuren ermittelt werden.



**Abb. 2.19: Sequenz der nativ-gereinigten Nt-SOX mittels N-terminaler Proteinsequenzierung.** Dargestellt sind die ersten 15 Aminosäuren des N-Terminus im Vergleich mit der bekannten Sequenz der At-SOX. Homologe Aminosäuren sind mit einem \* in der Konsensus-Sequenz gekennzeichnet. Zur N-terminalen Sequenzierung wurden 5 µg nativ-gereinigte Nt-SOX elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet.

In der Abbildung 2.19. ist das Ergebnis der Proteinsequenzierung der Nt-SOX im Vergleich zur bekannten Aminosäuresequenz der At-SOX dargestellt. Es zeigte sich eine hohe Homologie der Sequenzen. Insgesamt waren 9 der 14 Aminosäuren identisch. Im Bereich der zweiten bis achten Aminosäure lag die Homologie bei 100%. Aufgrund des Ergebnisses der N-terminalen Proteinsequenzierung konnte die native Reinigung der SOX aus *N. tabacum* bestätigt werden.

## **2.7 Vergleichende biochemische Charakterisierung der rekombinant exprimierten At-SOX und der nativen Nt-SOX**

Hauptziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung der ersten identifizierten pflanzlichen SOX aus *A. thaliana*. Diese Studie der rAt-SOX umfasste die proteinbiochemische-, spektroskopische- und enzymkinetische Charakterisierung des Proteins im Vergleich mit der nativen Nt-SOX.

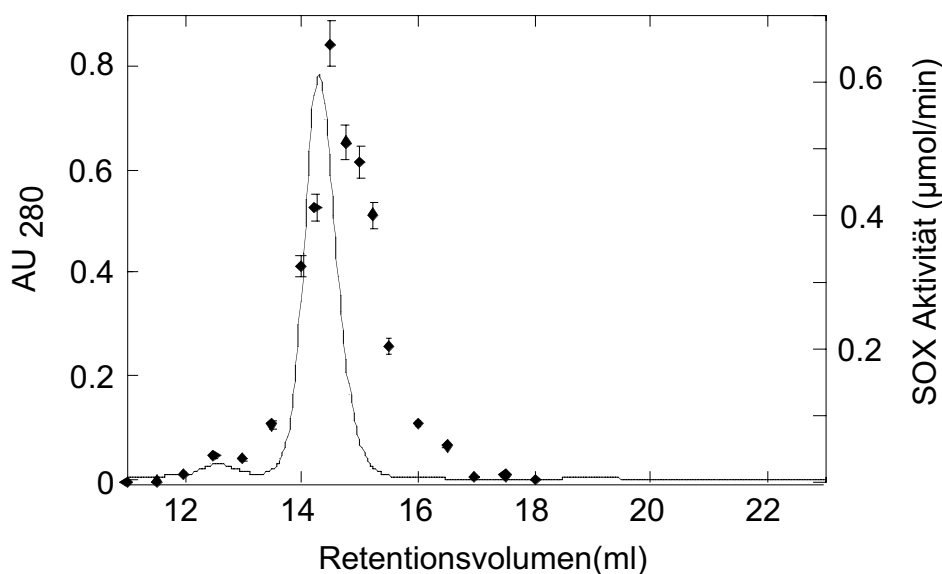
### **2.7.1 Bestimmung der apparenten molekularen Masse der rAt-SOX**

Die apparente molekulare Masse der rekombinant exprimierten At-SOX sollte durch Gelfiltration an einer Superdex 200-Säule (AP Biotech, Freiburg) ermittelt werden. Die Bestimmung der apparenten molekularen Masse der rAt-SOX wurde nach Kalibrierung der Säule mit einem Standard-Protein-Mix (BioRad) berechnet. Die rAt-SOX zeigte einen Elutionspeak bei 14,30 ml, welcher auf eine dominante Monomer-Form (kalkuliert 39,53 kDa) hinwies (Abb. 2.20). Weiterhin trat ein kleiner Elutionspeak bei 12,61 ml auf, welcher die Dimer-Form (kalkuliert 109,37 kDa) repräsentierte. Die apparenten molekularen Massen ( $M_r$ ), die sich aus der Primärsequenz des Proteins berechnen ließen, lagen mit 44,58 kDa für das Monomer und 89,16 kDa für das Dimer für eine Proteinseparierung auf der Superdex 200-Matrix im kalkulativen Bereich. Daher wurde auf eine weiterführende Berechnung der Stokes'schen Radien der Proteinformen verzichtet.

Ein durchgeführter immunologischer Nachweis der rAt-SOX mit den Elutions-Fraktionen zeigte, dass die rAt-SOX in einem etwa 2 ml umfassenden Elutionsbereich zwischen 13,5 ml bis 15,5 ml von der Säule eluierte. In den Fraktionen, welche nach dem Elutionsprofil zu urteilen etwa 90% des Proteins in einer monomeren Form enthielten,

konnte auch ein Antikörper-Signal für das Dimer detektiert werden. Da diese Proteinfraction während der Gelfiltration ausschließlich als Monomer vorlag, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich nach der Elution im Proteinansatz unter Salzbedingungen erneut sofort ein Gleichgewicht zwischen dimerer und monomerer Form eingestellt hat. Dass es sich bei der Dimerisierung um eine starke Bindung handeln muß, zeigt das deutliche Antikörper-Signal im immunologischen Nachweis nach Separierung der Proteine im denaturierenden SDS-Gel.

Im weiteren wurden die erhaltenen Elutionsfraktionen auf ihre SOX-Aktivität im Ferricyanid-Assay untersucht, und es zeigte sich eine mit der eluierenden rAt-SOX korrespondierende SOX-Aktivität (Abb. 2.20). Die Messung der Enzym-Aktivität (Ferricyanid-Reduktase) konnte erst nach Umpuffern der Fraktionen durchgeführt werden, da durch die starke Salzinhibition (Kap. 2.8.2.2) der rAt-SOX die Messung im Elutionspuffer der Gelfiltration nicht möglich war.



**Abb.2.20: Chromatogramm einer Gelfiltration über Superdex 200 der rAt-SOX.** 150  $\mu$ g rAt-SOX wurden über eine Superdex 200-Säule bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,3 ml/min gelfiltriert. Die 0,5 ml-Eluatfraktionen wurden anschließend über Sepharose G-50-Matrix in 20 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,5 umpuffert und auf ihre Ferricyanid-Reduktase-Aktivität getestet.

### **2.7.2 Identifizierung und Charakterisierung des Molybdäncofaktors der rAt-SOX mittels HPLC-Analyse und *nit*-1-Assay**

In eukaryotischen Molybdoenzymen bildet das an MPT gebundene Molybdän den redoxaktiven Molybdäncofaktor. Die Bindung des Molybdäns an das Pterin-Grundgerüst wird durch eine Dithiolengruppierung und zwei weitere Liganden am Mo-Atom vermittelt (Kramer *et al.*, 1987). Prokaryotische Varianten des Moco wurden erstmals 1986 und 1987 durch Krüger und Meyer postuliert und später verifiziert (Johnson *et al.*, 1990). Bei diesen Formen des Kofaktors binden verschiedene Mononukleotide (CMP, GMP, AMP, IMP) über eine Pyrophosphatbindung an das C4'-Atom der Seitenkette des MPTs. Im folgenden sollte der Molybdäncofaktor in der At-SOX mittels HPLC-Analyse (Kap. 4.2.8) identifiziert werden und seine rekonstitutive Aktivität im *nit*-1-Assay (Kap. 4.2.7) untersucht werden.

#### **2.7.2.1 Charakterisierung des Molybdäncofaktors aus rAt-SOX**

Die Identifikation und Charakterisierung des O<sub>2</sub>-labilen Molybdäncofaktors erfolgte in Form seines stabilen fluoreszierenden FormA-Derivates.

Das rekombinant exprimierte und aufgereinigte rAt-SOX-Protein wurde einer FormA-Analyse (Kap. 4.2.8) unterzogen. Nach einer Proteindenaturierung bei 95°C, einer alkalischen Phosphatase-Behandlung und einer Anreicherung der niedermolekularen Substanzen durch eine QAE-Austauscher-Chromatographie wurde das stabile, fluoreszente Oxidationsprodukt FormA-Dephospho mittels HPLC-Analyse detektiert. Hierbei waren sowohl die Emissionsmaxima des Fluoreszenzspektrums, als auch die Retentionszeiten von einer C18 Reverse Phase Säule, mit denen eines mitgeführten Standards aus



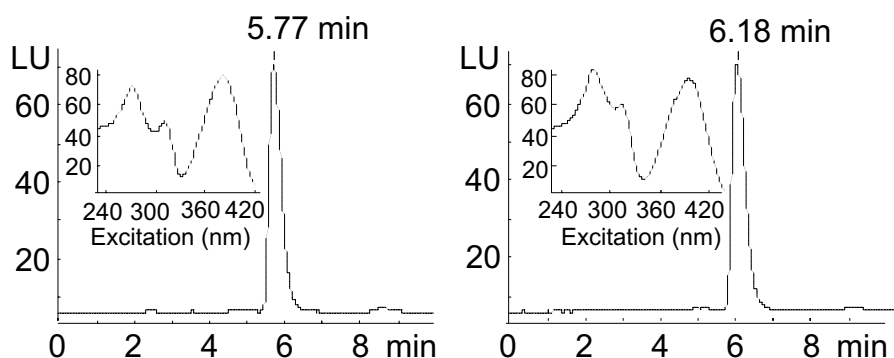
Xanthinoxidase vergleichbar (sh. Abb. 2.21). Das Verhältnis von eingesetztem rAt-SOX-Protein (1155 pmol) zu detektierbarem MPT (958 pmol) lag bei 1 : 0,829, was eine Sättigung von 83% bedeutete.

Wird die Proteindenaturierung bei 25°C durchgeführt, kann durch die variierenden Retentionszeiten zwischen FormA-Dinukleotid und FormA an der C18 Reverse Phase Säule unterschieden werden. Bei dieser Aufarbeitung der rAt-SOX konnte eine Elution einer Dinukleotidform des MPTs (z.B. MGD, MCD) nicht beobachtet werden. Die Menge an aufgereinigtem MPT blieb fast identisch.

Die Charakterisierung des Molybdänkofaktors in der rAt-SOX zeigt, dass es sich dabei um den gleichen MPT-Typ des Moco handelt, der auch in den anderen bekannten eukaryotischen SOXn nachgewiesen werden konnte (Hille, 1997). Wie durch Kappler *et al.*, 2000 beschrieben, liegt dieser Typ auch im prokaryotischen System vor. Die Arbeiten identifizierten eine bakterielle SOX in *Thiobacillus novellus* mit assoziiertem MPT ohne Dinukleotid. So kann geschlossen werden, dass für die SOXn in allen bisher bekannten Organismen MPT als Kofaktor spezifisch zu sein scheint.

### Kontrolle (XO)

### rAt-SOX



**Abb. 2.21.: Präparation von FormA-diphospho aus rAt-SOX-Protein und als Standard aus Xanthinoxidase.** In den Diagrammen ist die HPLC-Elution von FormA-diphospho bei isokratischem Fluß in 50 mM Ammonium-Acetat, 12,5% Methanol an einer C-18 Reverse Phase Säule dargestellt. Die Fluoreszenz wurde über eine Excitation von 370 nm und einer Emmission von 450 nm gemessen. Die Fluoreszenzspektren (innere Diagramme) zeigen ein Maximum bei 380 nm, über das durch den molaren Extinktionskoeffizienten von FormA  $\epsilon = 13.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  die Konzentration bestimmt werden kann.

### 2.7.2.2            **Rekonstitution der *nit-1*-Aktivität durch den Molybdäncofaktor aus rAt-SOX**

Die *Neurospora crassa* Mutante *nit-1* zeichnet sich durch eine Defizienz im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese aus. Die als Apoprotein im Pilzextrakt vorliegende inaktive Nitrat-reduktase kann jedoch durch Zugabe von exogenem MPT/Moco in ihrer Aktivität rekonstituiert werden (Kap. 4.2.7.).

Eine Restauration der NR-Aktivität war qualitativ durch die Zugabe von rAt-SOX-Protein zum Proteinextrakt der *nit-1*-Mutante aus *N. crassa* zu beobachten. Eine vorherige Denaturierung, die auf eine erschwerte Freisetzung des Moco aus dem Protein hinweisen würde, war für die Rekonstitution nicht nötig. Desweiteren konnte sowohl mit, als auch ohne Molybdän im Reaktionsansatz eine Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings war die gemessene Aktivität im Ansatz mit Molybdän etwa dreimal höher, als im Ansatz ohne Molybdän.

Durch den *nit-1*-Rekonstitutionsassay konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte rAt-SOX-Protein Molybdäncofaktor und MPT gebunden hatte. Die Bindung von MPT an das SOX-Apoprotein ist nur schwach, so dass der Kofaktor auch anderen Nutzern (NR-Apoprotein) frei zugänglich ist, ohne das Protein denaturieren zu müssen.

### 2.7.3 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) der rAt-SOX

Eine isoelektrische Fokussierung des gereinigten rAt-SOX-Proteins wurde durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über die Homogenität der Proteinlösung zu erhalten. So können verschiedene Degradationsprodukte und Isoformen mit unterschiedlicher Faltung stark abweichende isoelektrische Punkte (pI) aufweisen. Aus der Kenntnis des isoelektrischen Punktes können Aussagen über das Löslichkeitsverhalten bei verschiedenen Pufferbedingungen und die chromatographischen Laufeigenschaften an Ionenaustauscher-Matrices getroffen werden.

Der für die rAt-SOX berechnete theoretische pI von 8,91 konnte durch eine isoelektrische Fokussierung in einem nativen pH-Gradienten-Fertiggel mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis pH 9 nicht bestätigt werden. Das Protein lief außerhalb des trennbaren Gelbereiches oberhalb von pH 9. Eine Aussage über die Homogenität des gereinigten Proteins konnte aufgrund dieser Tatsache ebenfalls nicht getroffen werden.

Spätere Untersuchungen der gereinigten rAt-SOX zeigten, dass ein Teil des Proteinpools einen stark abweichenden isoelektrischen Punkt aufwies, der bei  $pI = 6,4$  lag (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bekräftigt die Annahme, dass während der Reinigung zwei unterschiedliche Proteinfractionen vorliegen. Zum einen mit Moco-gesättigtes aktives Protein ( $pI = 6,4$ ) und zum anderen rAt-SOX-Apoprotein ohne Cofaktor ( $pI = \sim 9,0$ ). Dieser Sachverhalt war auch während der nativen Reinigung einer pflanzlichen SOX aus *N. tabacum* (Nt-SOX) deutlich zu beobachten.

## **2.8            Enzymologische Charakterisierung der rekombinant-exprimierten At-SOX und Mm-SOX sowie der nativ-gereinigten Nt-SOX**

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der enzymologischen Charakterisierung der rekombinant-exprimierten At-SOX. Die Expression eines eukaryotischen Proteins in einem prokaryotischen Organismus kann Auswirkungen auf die Enzymaktivität haben, da posttranslationale Modifikationen oft nicht möglich sind. Durch die Reinigung der ersten pflanzlichen SOX aus *N. tabacum* konnten die erzielten Daten mit einer nativen SOX verglichen werden und eventuelle Unterschiede diskutiert werden.

Das sich verändernde Verhalten der Proteine/Enzyme während der Substratumsetzung konnte sowohl durch spektroskopische Methoden, als auch durch enzymkinetische Methoden verfolgt werden.

### **2.8.1            Spektroskopische Analyse der rAt-SOX**

Bei der Absorption von sichtbarem oder ultraviolettem Licht werden Übergänge zwischen elektronischen Energieniveaus bewirkt. Die einfallende Strahlung hebt ein Elektron aus einem energetisch niedrigeren in ein energetisch höheres Orbital. Neben den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin weisen viele in natürlich vorkommenden Proteinen enthaltene Chromophore eine intensive Absorption im Wellenlängenbereich von 180–800 nm auf. Die während einer katalytischen Umsetzung mögliche Konformationsänderung eines Enzyms kann ebenfalls absorptionsspektroskopisch verfolgt werden.

Mit der EPR-(elektronenparamagnetische Resonanz) Spektroskopie wurde eine weitere spektroskopische Methode genutzt. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Moleküle mit paramagnetischen Eigenschaften, d.h. mit ungepaarten Elektronen untersuchen. Ungepaarte

Elektronen bewegen sich in einem magnetischen Feld entweder parallel oder antiparallel zur Feldachse. Ein oszillierendes Magnetfeld im rechten Winkel zur Feldachse induziert Übergänge zwischen den beiden Spinzuständen. EPR-Spektren sind charakterisiert durch ihre Linienform, die Kopplungskonstante  $a$  und den  $g$ -Faktor. Die Kopplungskonstante  $a$  ergibt sich aus dem Abstand der spektralen Linien und ist ein Maß für die Wechselwirkung des Elektrons mit dem lokalen Feld des Kerns. Den  $g$ -Faktor erhält man aus dem Mittelpunkt des Spektrums, und er ist ein Maß für das mit dem externen Magnetfeld in Wechselwirkung stehende Gesamtmoment aus Spin- und Orbitalmoment. Im Falle der SOX lässt sich das Auftreten des Übergangsmetall Molybdän für diese Art der spektroskopischen Analyse ausnutzen. Aufgrund der geringen Ausbeute an nativ-gereinigtem Nt-SOX-Proteins wurden die spektroskopischen Analysen ausschließlich mit rekombinant exprimierten Proteinen (rAt-SOX und rMm-SOX) durchgeführt.

Neben den biochemischen Daten sollten auch spektroskopische Methoden zur Charakterisierung der rAt-SOX und rMm-SOX verwendet werden. Dies im besonderen, da die SOXn der Säuger in den letzten Jahren einer gründlichen spektroskopischen Charakterisierung unterzogen wurden und so als Vergleich herangezogen werden konnten.

### **2.8.1.1 UV/vis-Spektroskopie**

Das UV/vis-Spektrum der SOXn aus Säugern ist durch die starke intensive Absorption der prosthetischen Häm-Gruppe geprägt. Die oxidierte Enzymform weist durch die stark absorbierende Häm-Gruppe eine Soret-Bande bei 414 nm mit einem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 99,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  auf. In der reduzierten Form verschiebt sich diese Soret-Bande auf 424 nm ( $\epsilon = 142 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Außerdem treten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden bei 558 nm ( $\epsilon = 23,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und 528 nm ( $\epsilon = 12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) auf. Durch die Verschiebung der

Soret-Bande von 414 nm<sub>ox</sub> zu 424 nm<sub>red</sub> kann der Elektronentransfer von der Moco-Domäne zur Häm-Domäne spektroskopisch verfolgt werden. Für die rekombinant-exprimierte Mm-SOX konnte ein solches für SOXn aus Säugern typisches UV/vis-Spektrum aufgenommen werden (Abb. 2.22A). Zu erkennen ist die dominante Absorption der Hämgruppe und die beschriebene spektrale Verschiebung bei einer Reduktion durch Sulfite oder Dithionit.

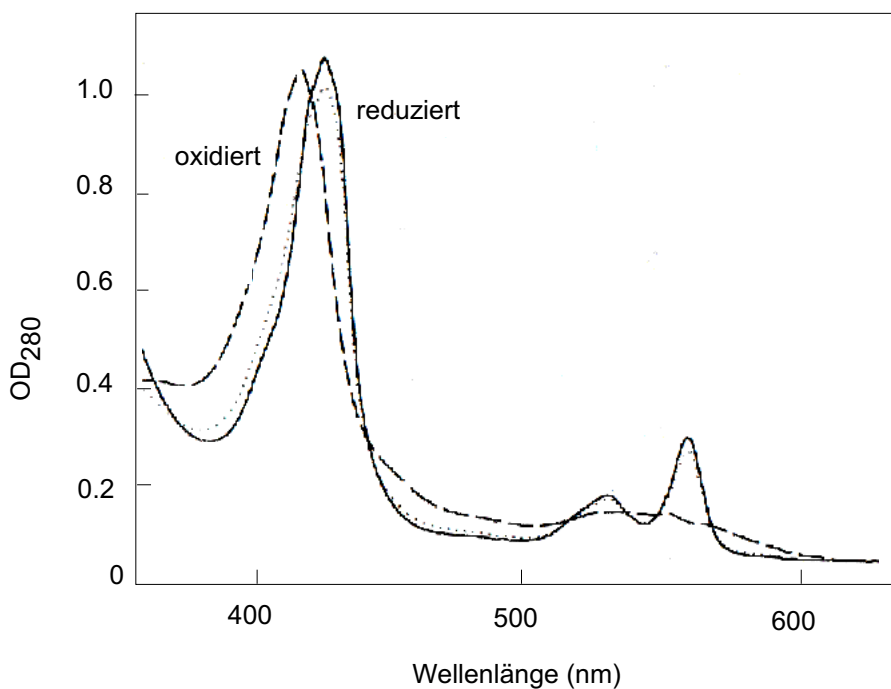
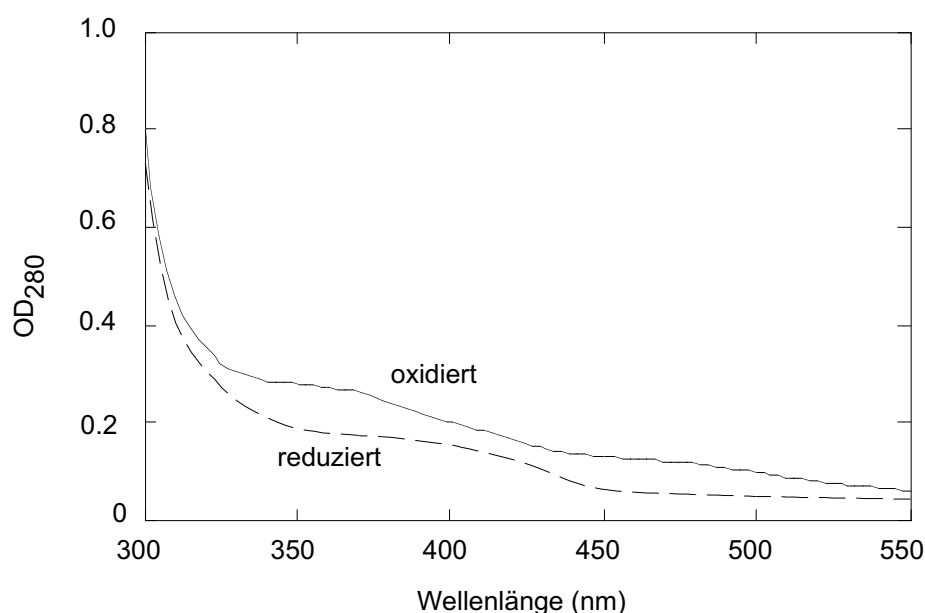


Abb. 2.22A: UV/vis-Spektrum des rekombinant-exprimierten und gereinigten rMm-SOX-Proteins (2,4 µM). Das Spektrum der oxidierten Form der rMm-SOX (gestrichelte Linie) im Vergleich mit der durch eine äquimolare Menge an Sulfite reduzierten Form (durchgezogene Linie) bzw. durch Dithionit reduziert (gepunktete Linie).

Im Gegensatz dazu weist die pflanzliche SOX aus *A. thaliana* eine geringe Absorption im vis-Bereich auf (Abb. 2.22B). Eine Moco-Domänen-spezifische Absorption konnte bei etwa 355 nm beobachtet werden. Bei dieser Wellenlänge verringert sich die Absorption des Proteins bei Reduktion durch Sulfite (äquimolare Mengen) am stärksten.

Übereinstimmend mit der Genanalyse der pflanzlichen SOX zeigt das UV/vis-Spektrum deutlich die Abwesenheit einer Häm-Gruppe. Dem aufgenommenen Spektrum fehlt die starke Soret-Absorption im Bereich von 400-420 nm, die charakteristisch für die Häm-Gruppe ist. Stattdessen ist das Spektrum des oxidierten Enzyms mit einem Absorptionsmaximum bei 355 nm und einer Schulter bei etwa 480 nm mit dem

veröffentlichten Spektrum (Johnson & Rajagopalan, 1977) einer Moco-Domäne identisch, die durch tryptischen Verdau der SOX aus *R. norvegicus* gewonnen und gereinigt wurde. Auch die rekombinante Moco-Domäne der humanen SOX zeigte dieses spektroskopische Verhalten im UV/vis-Bereich (Garrett & Rajagopalan, 1996). Diese beobachtete Absorption ist den Cystein-Molybdän- und Dithiolen-Molybdän-Bindungen zuzuschreiben (Garton & Rajagopalan, 1997) und verringert sich durch die Reduktion des Enzyms mit Sulfit.



**Abb. 2.22B: UV/vis-Spektrum des rAt-SOX-Proteins (1,5 µM).** Das Spektrum der oxidierten Form der rAt-SOX (durchgezogene Linie) im Vergleich mit der durch eine äquimolare Menge an Sulfit reduzierten Form (gestrichelte Linie).

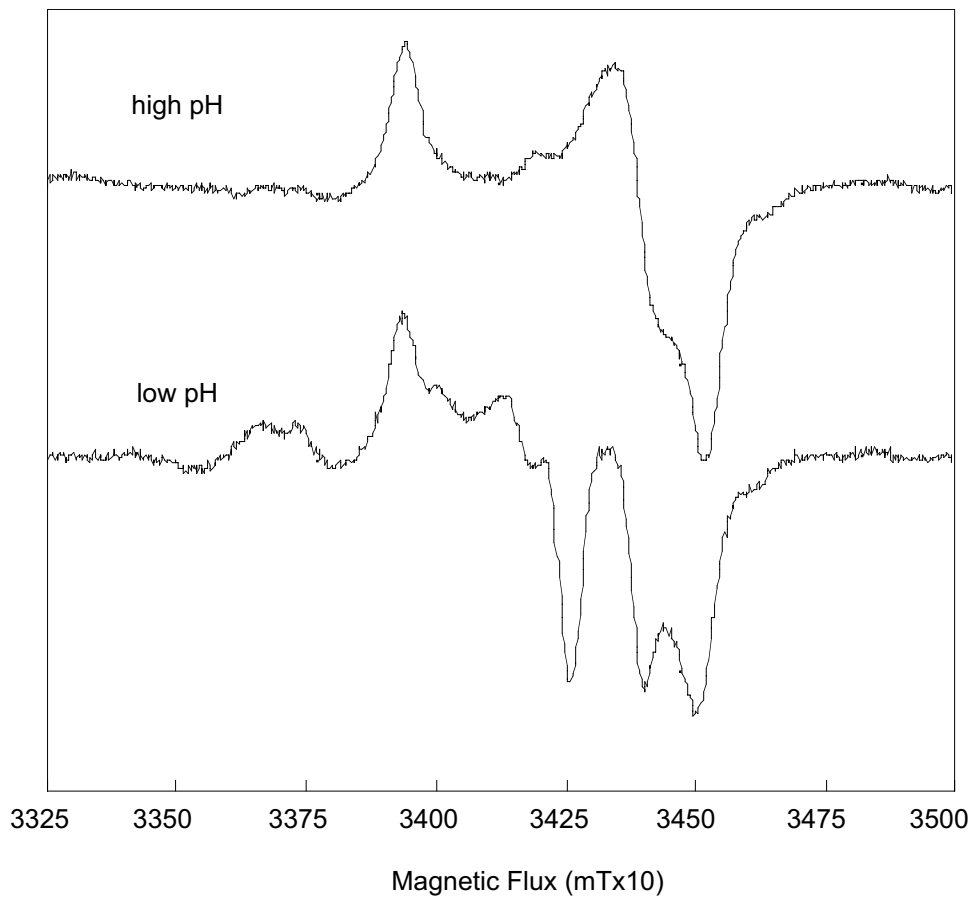
### 2.8.1.2 EPR-spektroskopische Analyse des Mo-Zentrums

Elektronen-paramagnetische-Resonanz (EPR)-Studien können zur Charakterisierung der chemischen Natur des Molybdän-Zentrums innerhalb des aktiven Zentrums eingesetzt werden. Dabei macht man sich die EPR-Aktivität des  $\text{Mo}^{\text{V}}$ -Zentrums zu nutze, welches sich bei der Umsetzung von Sulfit zu Sulfat kurzfristig als Intermediat bildet (s. Reaktionsmechanismus). Ist der Anteil des mit Moco-saturierten Proteins in der

Proteinlösung hoch, so können deutliche und für SOXn spezifische Spektren aufgenommen werden. Die EPR-Spektren der rAt-SOX bei pH 10 („high-pH“) und pH 6,5 („low-pH“), unter teilweise reduzierenden Bedingungen (Sulfit oder Dithionit), sind in Abb. 2.23 dargestellt. Dabei lag das Enzym bei einem pH-Wert von 10 in einem 20 mM Glycin-Puffer und bei einem pH-Wert von 6 in einem 20 mM Bis-Tris-Puffer vor. Die ermittelten g-Werte bei „high-pH“-Bedingungen waren distinkt und mit  $g_{1,2,3} = 1,991; 1,965; 1,958$  identisch zu den beobachteten g-Werten ( $g_{1,2,3} = 1,987; 1,9641; 1,953$ ) der SOX aus *G. gallus* unter gleichen Bedingungen (Lamy *et al.*, 1980). Bei „low-pH“-Bedingungen zeigt die SOX aus *G. gallus* eine charakteristische Verschiebung der g-Werte ( $g_{1,2,3} = 2,004; 1,972; 1,966$ ) und ein Auftreten von „hyperfine-splitting“-Signalen ( $a_{1,2,3} = 8,5; 8,0; 13,0$  G), die durch eine verstärkte Kopplung eines Protons zustande kommen (Lamy *et al.*, 1980). Diese Beobachtung konnte bei der At-SOX nicht gemacht werden. Vielmehr handelt es sich bei dem EPR-Signal der At-SOX unter „low-pH“-Bedingungen um ein zusammengesetztes Spektrum der letzten beiden EPR-aktiven Species der Reaktion. Weitere Versuche, durch Variation des pH-Wertes und Zugabe an 0,1 M Phosphat ein distinktes Signal ähnlich dem EPR-Signal der SOX aus *G. gallus* unter „low-pH“-Bedingungen zu erhalten, blieben erfolglos. Erschwert wurde dies zusätzlich durch die geringe Stabilität des rAt-SOX-Proteins bei einem pH-Wert von 6,0.

Auf Grundlage des UV/vis-Absorptionsspektrums und der EPR-Signale ist der biochemische Charakter des Molybdän-Zentrums der pflanzlichen SOX identisch zum Molybdän-Zentrum der Säuger-SOXn und kann deutlich von dem Zentrum anderer Molybdoenzyme (Bsp. Nitratreduktase) unterschieden werden. Die fehlende Beobachtung der Phosphat-Inhibition und der g-Wert-Verschiebung bei „low-pH“-Bedingungen könnte auf einen Unterschied bei der Substratbindung durch veränderte Bindungskonstanten der beteiligten Aminosäurereste im aktiven Zentrum hindeuten.





**Abb. 2.23: EPR-Spektrum des rAt-SOX-Proteins bei verschiedenen pH-Werten.** 10  $\mu\text{M}$  des Enzyms wurden in den jeweiligen Puffer (20 mM Glycin-Puffer = pH 10,0 und 20 mM Bis-Tris-Puffer = pH 6,5) umgepuffert und anschließend mit einer äquimolaren Menge an Sulfit reduziert. Die Instrumenteneinstellungen waren während der gewählten Scanzahl von 50 wie folgt: 9.458 GHz Mikrowellen-Frequenz, 10 mW Mikrowellen-Power, 100 kHz Modulations-Frequenz, 5.0 G Modulations-Amplitude und eine Temperatur bei 150 K.

### 2.8.2 Enzymkinetische Eigenschaften der rAt-SOX, rMm-SOX und Nt-SOX

Für die enzymologische Charakterisierung standen verschiedene enzymkinetische Methoden zur Verfügung. Zur Bestimmung der enzymspezifischen Konstanten der rAt-SOX, rMm-SOX und der Nt-SOX wurde der einfachste Fall einer enzymkinetischen Reaktion angenommen. Dabei verläuft die Reaktion irreversibel vom Umsatz eines

Substrates zum Produkt. Während der Reaktion unterscheidet man drei Phasen, welche deutlich in der Veränderung aller beteiligten Reaktionspartner zu unterscheiden sind:

- 1) kurze Anfangsphase der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes, geringe Umsatzgeschwindigkeit;
- 2) „*Steady-state*“ (Fließgleich-gewicht) Phase, konstante Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes, maximale Umsatzgeschwindigkeit;
- 3) Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes durch Verringerung des Substrates, Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit.

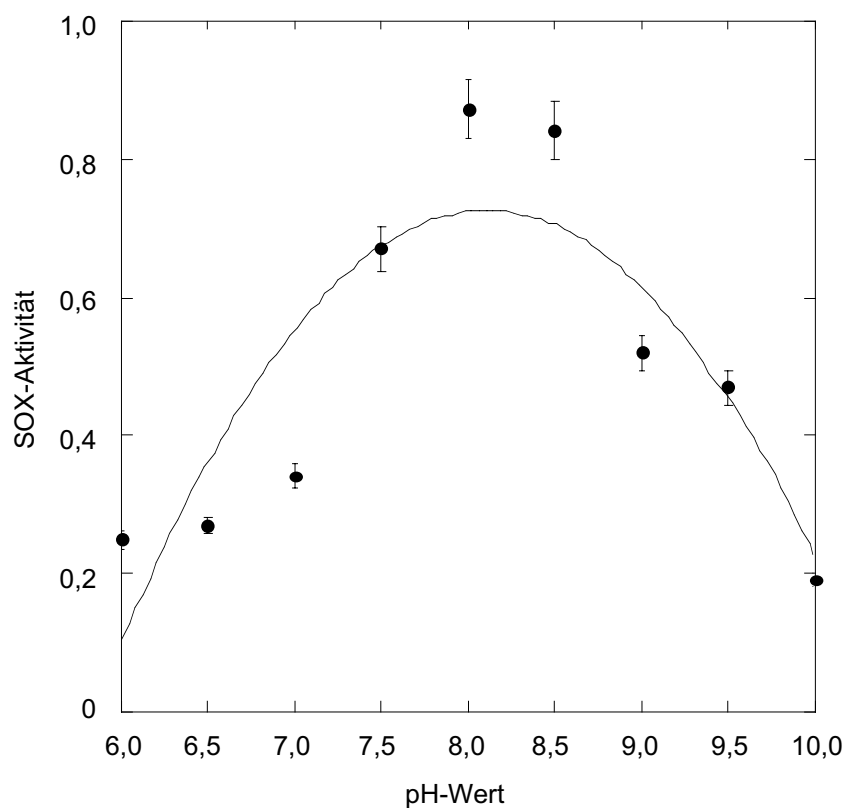
Durch Variation der Substratkonzentrationen im Reaktionsansatz konnten durch diese Messungen die für ein Enzym spezifischen kinetischen Konstanten ermittelt werden. Für enzymkinetische Methoden werden nur katalytische Mengen an Enzymmaterial benötigt, da aufgrund ihrer außerordentlichen katalytischen Wirkung bereits kleinste Enzymmengen große Mengen an Substrat in Produkt umwandeln können. Das entstehende Produkt läßt sich aufgrund seiner chemischen Verschiedenheit vom Substrat durch geeignete Methoden (z.B. spektroskopisch) gut unterscheiden und der Umsatz nachweisen. Die kinetischen Konstanten, die Michaelis-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit, wurden in der zweiten Phase des Fließgleichgewichtes ermittelt. In diesem Bereich liegt eine lineare Substratabnahme bzw. Produktbildung vor, und die Reaktion wird 0. Ordnung hinsichtlich des Substrates.

Als weitere enzymkinetische Methode wurde eine Fluss- oder Strömungsmethode („stopped-flow“) zur Messung schneller Reaktionen verwendet. Mit einer zeitlichen Auflösung im Millisekundenbereich lassen sich im Gleichgewicht befindliche Reaktionen verfolgen. Zu solchen Reaktionen zählen Ligandenbindungen, Isomerisierungen oder spontane und induzierte Konformationsänderungen, bei Makromolekülen. Als Detektionssystem für das „Stopped-flow“-Gerät diente ein Absorptions-Photometer mit variabler Wellenlänge für den UV- und sichtbaren Bereich. Aufgrund der in kurzer Zeit zu erfassenden geringen Absorptionsänderungen (ca. 0,01-0,2) arbeitet das Gerät wesentlich

empfindlicher als normale Spektralphotometer. Es lassen sich Reaktionen verfolgen, die bei einer „steady-state“-Messung nicht mehr erfassbar sind. Hierzu gehört die wahre Anfangsgeschwindigkeit bei geringen Substratkonzentrationen, die bei manuellem Mischen bereits vor Einsetzen des Messvorgangs in der Küvette abgelaufen wäre. Mit Hilfe dieser Methode zur Messung schneller kinetischer Reaktionen war es möglich, Teilprozesse der Enzymreaktion der SOX aus *G. gallus* (Brody, Hille, 1999) zeitlich voneinander zu trennen und die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte zu bestimmen. Dies sollte auch für die rAt-SOX versucht werden.

Durch Archer *et al.*, 1972 wurde erstmals eine mögliche Oxidationsreaktion von reduzierten Pterinen durch Ferricyanid beschrieben. Gardlik und Rajagopalan (1990) konnten eine oxidative Modifikation der Moco-Domäne aus Sulfitoxidasen von *R. norvegicus* und *G. gallus* durch diesen Elektronenakzeptor beschreiben. Im Gegensatz zu Sulfitoxidasen aus Säugern, die aus einer Moco- und Häm-Domäne bestehen, besitzt die pflanzliche SOX ausschließlich eine Moco-Domäne. Daher wurden Messungen angewandt, die Elektronenakzeptoren beinhalteten, welche die Elektronen direkt von dieser Domäne erhielten. Zum einen stand das bereits beschriebene Ferricyanid und zum anderen das reaktivere Ferricenium-hexafluorophosphat als Elektronenakzeptoren zur Verfügung. Beide Akzeptoren können die überschüssigen Elektronen in einem Ein-Elektronen-Übertrag direkt von der Moco-Domäne übernehmen. Der Umsatz des Akzeptors kann spektroskopisch verfolgt werden. Für die im Zuge dieser Arbeit ebenfalls klonierte SOX aus der Maus stand neben diesen Enzymassays auch noch der Assay mit Cytochrom c als Elektronen-akzeptor zur Verfügung. Nach dem intramolekularen Elektronentransfer von der Moco-Domäne zur Häm-Domäne übernimmt Cytochrom c die Elektronen an der Cytochrom b<sub>5</sub>-Domäne.

Zunächst wurde das jeweilige pH-Optimum der durch das Enzym katalysierten Reaktion ermittelt. Dabei wurden die Aktivitäten der Reaktionsansätze in 20 mM Tris-HCl und 20 mM Bis-Tris in einem pH-Wert-Bereich von 6,0-10,0 in 0,5-Schritten vermessen. Die Abb. 2.24 zeigt das pH-Optimum der Sulfit-abhängigen Ferricyanid-Reduktase-Aktivität der rAt-SOX bei 8,0.

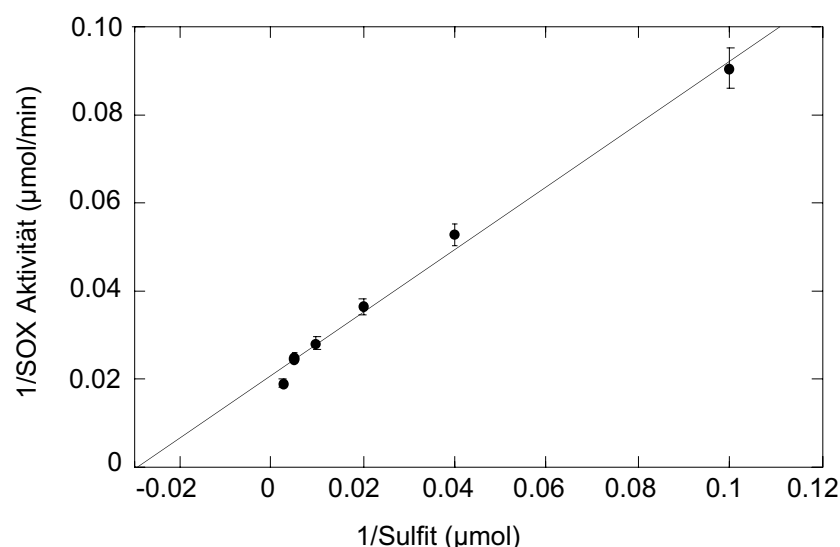


**Abb. 2.24: Ferricyanid-Reduktase-Aktivität der rAt-SOX unter verschiedenen pH-Bedingungen.** Äquimolare Mengen der rAt-SOX (2,4 µg) wurden zur Messung der SOX-Aktivität durch den Elektronenakzeptor Ferricyanid eingesetzt. Die Puffer der verschiedenen pH-Werte wurden mit 20 mM Tris/HCl (pH 6,0-8,5) und 20 mM Bis-Tris (pH 9,0-10,0) eingestellt.

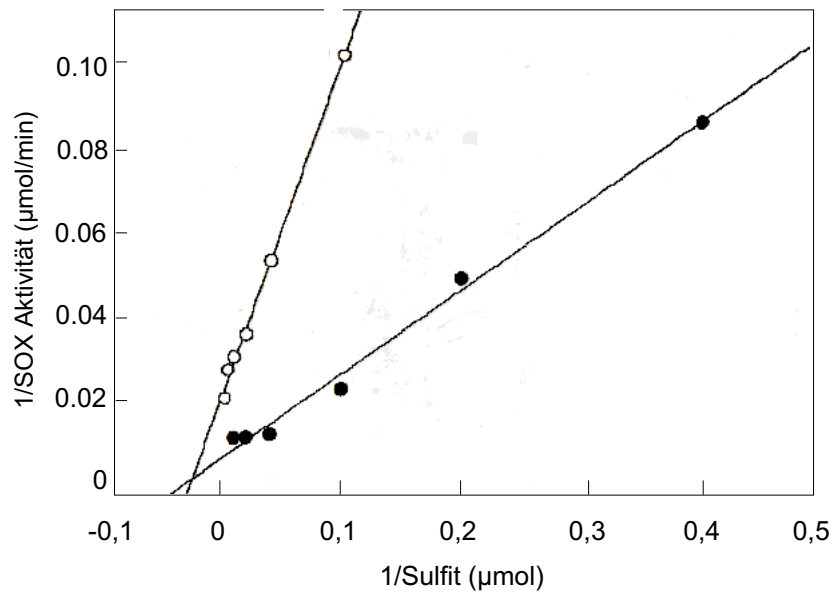
### 2.8.2.1 Katalytische Eigenschaften der rAt-SOX, rMm-SOX und Nt-SOX

Die Ermittlung der apparenten  $K_m$ -Werte für Sulfit und Ferricyanid wurden bei variierender Konzentration des Substrates Sulfit und des Elektronenakzeptors Ferricyanid in saturierender Konzentration durchgeführt. Abb. 2.25 zeigt eine „steady-state“ Kinetik der rAt-SOX, gemessen im Ferricyanid-Assay. Dargestellt ist ein doppelt-reziproker Plot (Lineweaver-Burk) der Enzymaktivität. Die aus dieser Messung berechneten  $K_m$ -Werte für Sulfit und Ferricyanid wurden mit 33,8  $\mu\text{M}$  bzw. 5,1  $\mu\text{M}$  ermittelt.

Durch die Messung der Enzymaktivität mit dem Elektronenakzeptor Ferricenium-hexafluoro-phosphat (Abb. 2.26), konnte bei einer Absorptionsänderung von 0,015 AU/sec ein  $K_m$ -Wert von 20,6  $\mu\text{M}$  für Sulfit ermittelt werden.



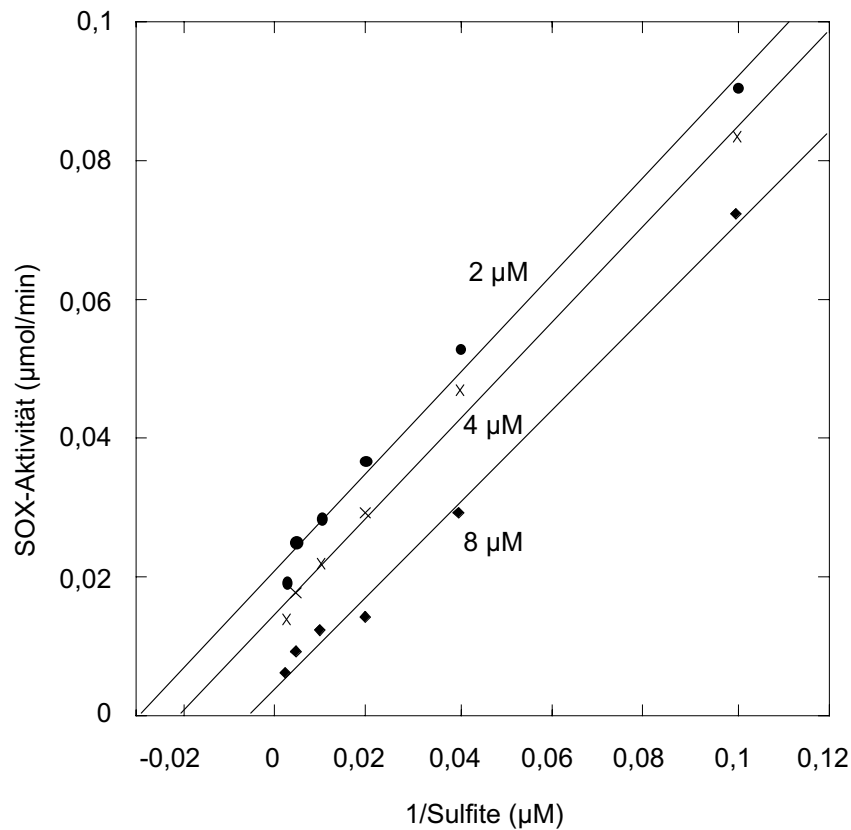
**Abb. 2.25: Lineweaver-Burk-Plot einer „steady-state“-Kinetik der rAt-SOX bei variierender Sulfitkonzentration (10-400  $\mu\text{M}$ ) und konstanter Ferricyanid-Konzentration (395  $\mu\text{M}$ ).** Die Reaktion wurde mit 2,0  $\mu\text{M}$  rAt-SOX initiiert und die Absorptionsänderung bei 420 nm verfolgt.



**Abb. 2.26: Lineweaver-Burk-Plot einer „steady-state“-Kinetik der rAt-SOX bei variierender Sulfitkonzentration (2,5-400 µM) und konstanter Ferricenium-hexafluorophosphat-Konzentration (185 µM).** Die Reaktion wurde mit 1,5 µM rAt-SOX initiiert und die Absorptionsänderung bei 300 nm verfolgt.

Um Aussagen über den Reaktionsmechanismus treffen zu können, mussten Messungen vorgenommen werden bei denen sich beide Substrate in nicht-saturierten Konzentrationen im Ansatz befanden. Der doppelt-reziproke Auftrag der separaten Daten ergibt parallele Graphen, was auf eine Mehrsubstratreaktion nach dem Ping-Pong-Mechanismus hindeutet (Abb. 2.27). Diese Art von Reaktionsmechanismus wurde auch in anderen Sulfitoxidasen beschrieben und tritt auf, wenn zwei aktive Zentren innerhalb des Enzyms während der Reaktion involviert sind.

Eine nähere Charakterisierung der Enzymreaktion durch Messung der reduktiven und oxidativen Halbreaktionen an einer „stopped-flow“-Apparatur, wie es für die SOX aus *G. gallus* durchgeführt wurde (Brody, Hille, 1999), konnte aufgrund der geringen Absorptionsänderungen im UV/vis-Bereich mit der rAt-SOX nicht durchgeführt werden.

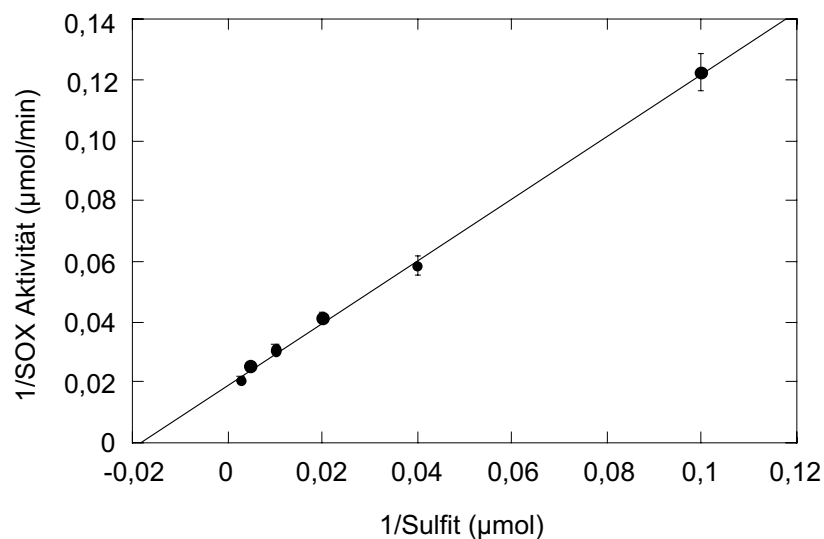


**Abb. 2.27: Festlegung des Reaktionsmechanismus der rAt-SOX. Lineweaver-Burk-Plot von SOX-Aktivitäten bei einer Ferricyanid-Konzentration von 395  $\mu\text{M}$  und variierenden Sulfitkonzentrationen (2,5-400  $\mu\text{M}$ ).** Für die Initiierung der Reaktion wurden 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  und 8  $\mu\text{M}$  der rAt-SOX eingesetzt und die Absorptionsänderung bei 420 nm verfolgt.

Neben der Bestimmung der apparenten Enzymparameter für die rekombinant-exprimierte SOX aus *A. thaliana* (rAt-SOX) sollten diese Daten auch für die rekombinante SOX aus *Mus mus* und der nativ-gereinigten SOX aus *N. tabacum* ermittelt werden. Im Gegensatz zur rAt-SOX konnte bei der rMm-SOX die Enzymaktivität durch die Cytochrom c-Reduktase-Aktivität vermessen werden. Bei einer Absorptionsänderung von 0,049 AU/sec (entspricht einem Umsatz von 2,5  $\mu\text{M}$  Cytochrom c/sec) lag der  $K_m$ -Wert für Sulfit bei 21,9  $\mu\text{M}$ , was im Bereich der Enzymparameter für andere tierische Sulfitoxidasen liegt.

Durch die Reinigung der nativen SOX aus *N. tabacum* und Ermittlung der Enzymkonstanten konnten eventuell auftretende Modifikationen durch die Expression im

prokaryotischen System bei der rAt-SOX-Protein ausgeschlossen werden. Desweiteren konnten Schlussfolgerungen auf mögliche posttranslationale Modifikationen des Enzyms gezogen werden. Die Messung bei saturierten Konzentrationen an Sulfit ergab für das native Enzym aus *N. tabacum* einen apparenten  $K_m$ -Wert von 51,8  $\mu\text{M}$  für Sulfit (Abb. 2.28).



**Abb. 2.28:** Lineweaver-Burk-Plot einer „steady-state“-Kinetik der Nt-SOX bei variierender Sulfitkonzentration (10–400  $\mu\text{M}$ ) und konstanter Ferricyanid-Konzentration (395  $\mu\text{M}$ ). Die Reaktion wurde mit 2,0  $\mu\text{M}$  Nt-SOX initiiert und die Absorptionsänderung bei 420 nm verfolgt.

### 2.8.2.2 Inhibitionsstudien der rAt-SOX

Die bekannte Inhibition der SOXn aus Säugern durch Salze sollte auch bei der pflanzlichen SOX untersucht werden. Hierzu wurde der Ferricyanid-Assay mit ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Komponente durchgeführt und die Konzentration ermittelt, bei der eine 50%-ige Aktivität der rAt-SOX vorlag. Auffällig ist eine starke Inhibition im Tris/HCl-gepufferten System, in dem bereits eine Konzentration von 90 mM Tris/HCl zu



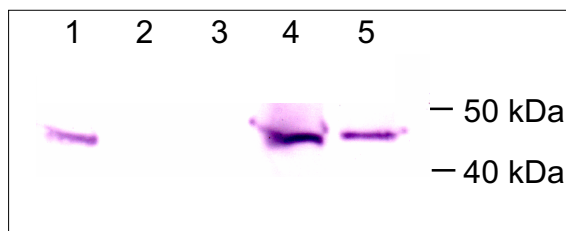
einer 50%-igen Aktivitätsminderung führte. Eine Inhibition der SOX-Aktivität durch Chlorid-Ionen wurde durch die Konzentration von 70 mM NaCl im 20 mM Tris/HCl-Puffer nochmals bestätigt. Desweiteren wurde die Enzymaktivität durch 30 mM Phosphat inhibiert. Bei dem Substratanalogon Nitrat reichte eine Konzentration von 1 mM aus, um die Aktivität auf 50% zu verringern. Weiterhin konnte eine Produkthemmung durch Sulfat festgestellt werden.

**Tab. 2.2: Bestimmung der Inhibition der Ferricyanid-Reduktase-Aktivität von der rAt-SOX .** Angegeben ist jeweils die Konzentration der Komponenten, die zu einer 50%-igen Inhibition der Ferricyanid-Reduktase-Aktivität führt.

Komponente	50% Inhibition SOX-Aktivität
Tris/HCl pH 8.5	90 mM
Kaliumphosphat pH 8.5	30 mM
NaCl (20 mM Tris/HCl pH 8.5)	70 mM
Kaliumnitrat	1 mM

## 2.9 Lokalisation der pflanzlichen SOX

Zur näheren Untersuchung der Funktion sollten die bereits aus den Datenbankanalysen ersichtlichen Hinweise auf eine subzelluläre Lokalisation des Enzyms in Peroxisomen experimentell bestätigt werden (Kap.2.1.4). Da im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des rekombinanten At-SOX-Proteins als Antigen polyklonale Antikörper in Kaninchen generiert wurden, konnte dies durch immunologische Methoden untersucht werden. Dabei war von Vorteil, dass der Antikörper gegen die rAt-SOX in vielen verschiedenen Pflanzenspecies ein eindeutig der SOX zuzuordnendes Signal (ca. 45 kDa) erkennen ließ (persönliche Mitteilung C. Witt).

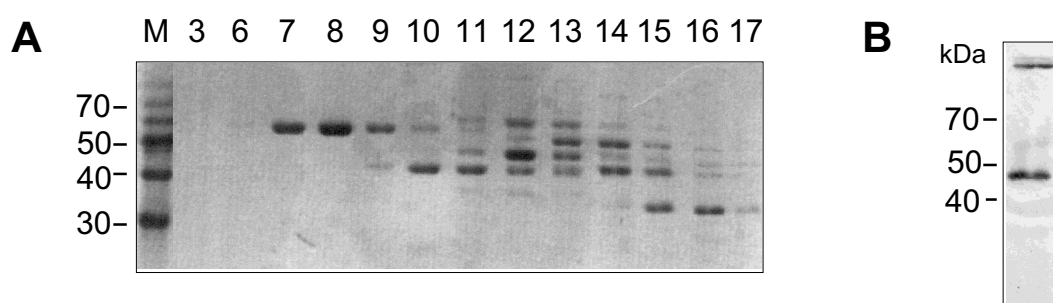


**Abb. 2.29: Immunologische Analyse verschiedener Organellenfraktionen aus *N. plumbaginifolia*.** Es wurden jeweils 15 µg Protein der verschiedenen Organellenfraktionen (1 = Gesamtzellextrakt, 2 = cytoplasmatische Fraktion, 3 = plastidäre Fraktion, 4 = mitochondriale/peroxisomale Fraktion, 5 = hoch-gereinigte peroxisomale Fraktion aus *S. tuberosum*) im SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und immunologisch (polyklonaler Ak 1:500) analysiert.

Zunächst wurde ein immunologischer Nachweis mit getrennten Zellfraktionen aus *N. plumbaginifolia* durchgeführt. Mittels Differentialzentrifugation wurden einzelne Zellorganellen-Fractionen aus Blättern von *N. plumbaginifolia* gewonnen. Die fraktionierten Organellen wurden separat durch einen osmotischen Schock lysiert und immunologisch analysiert. Die cytosolische und plastidäre Fraktion zeigte kein positives Antikörpersignal Abb. 2.29. In der mitochondrialen/peroxisomalen Fraktion konnte ein Signal in der Größe von 45 kDa nachgewiesen werden. Da bei einer Organellen-Reinigung

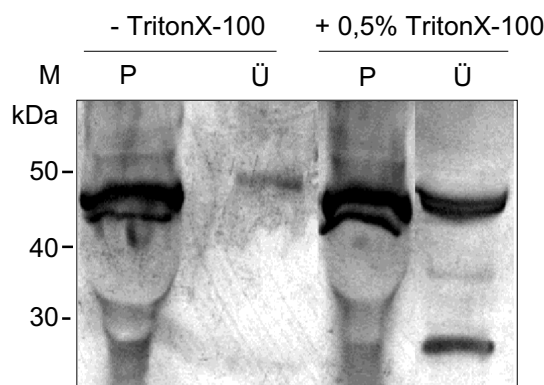
die Mitochondrien und Peroxisomen nicht leicht zu trennen sind, wurde eine aus *Solanum tuberosum* aufgereinigte mitochondriale/peroxisomale Fraktion über einen Sucrose-Gradienten nochmals aufgereinigt. Die erhaltene peroxisomale Fraktion zeigte ein deutliches Antikörpersignal.

Eine von Dr. Sigrun Reumann (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellte Peroxisomen-Fraktion aus Spinat, deren Reinheit durch Leitenzym-Messungen auf 85% geschätzt werden konnte, wurde für weitere Versuche verwendet. Zunächst wurde mit dem angereicherten peroxisomalen Proteinextrakt eine Gelfiltration über eine Superdex 200-Säule durchgeführt. Im immunologischen Nachweis des Proteinextraktes und der Eluatfraktionen wurde ein Signal, welches mit der molekularen Masse der At-SOX korrespondiert, detektiert. In Abb. 2.30 ist eine Coomassie-Färbung der Eluatfraktionen von einer Gelfiltration gezeigt. Von den distinkt-separierten einzelnen Proteinfractionen konnte ausschließlich in der Fraktion 12 ein positives Antikörpersignal visualisiert werden. Ähnlich wie schon bei den Reinigungsschritten der nativen SOX aus *N. tabacum* (Nt-SOX) konnte auch hier eindeutig sowohl das Dimer, als auch das Monomer detektiert werden.



**Abb. 2.30: Analyse der Gelfiltration mittels Superdex 200 von peroxisomalen Proteinen.** (A) Jeweils 20  $\mu$ l der 0,5 ml-Eluatfraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt (12,5%-iges SDS-Gel) und die Proteine anschließend durch Coomassie-Blau visualisiert. M: 10kDa-Standard-Proteine. (B) Immunologischer Nachweis in der Fraktion 12 durch die polyklonalen Antikörper gegen die rAt-SOX (1:500).

Eine Ultrazentrifugation dieses Proteinextraktes bei 100.000xg ergab, dass sich das gesamte Protein der SOX in der pelletierten Membranfraktion befand Abb. 2.31. Wurde der Ansatz mit 0,5% Triton-X100 vorinkubiert, konnte nach Sedimentation das SOX-Protein auch im löslichen Überstand detektiert werden, was auf eine Membranständigkeit bzw. Assoziation hindeutet. Bei dem zweiten, mit dem Antikörper kreuzreagierenden Signal (bei etwa 28 kDa) im Überstand der Sedimentation mit 0,5% Triton-X-100, könnte es sich um die degradierte Moco-Domäne handeln. Eine mögliche Membranständigkeit konnte bereits durch die Datenbankanalysen auf putative posttranslationale Modifikationsstellen angenommen werden. Hierbei traten mehrfach putative Bindungsstellen für Myristinsäure auf, die die Assoziation an Membranen vermitteln würde.



**Abb. 2.31: Immunologische Analyse einer Ultrazentrifugation von peroxisomaler Proteinfraction.** Die Proteinextrakte wurden in einer Airfuge (Beckman) bei 100.000xg für 1 h zentrifugiert und anschließend das Proteinpellet (P) von dem Überstand (Ü) getrennt. Jeweils 10 µg Protein wurden in einem 10%-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Der immunologische Nachweis erfolgte mit anti-rAt-SOX-Antikörper in einer Konzentration von 1:500.

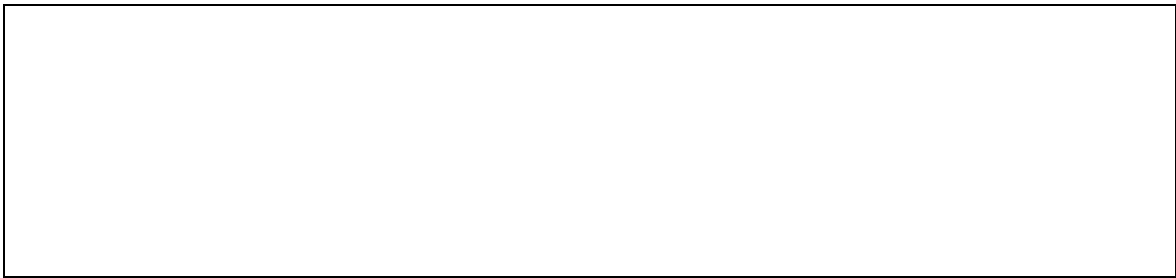
## **2.10 Biochemische Identifikation möglicher Interaktionspartner der At-SOX**

Die vergleichende molekularbiologische Charakterisierung der pflanzlichen SOX und der SOX aus Säugern zeigte bereits früh ein Fehlen der Häm-Domäne in der pflanzlichen Sequenz (Kap. 2.1.2). Dies konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten spektroskopischen Experimente weiter manifestiert werden (Kap. 2.8.1). Für die *in vivo* Enzymfunktion der separaten Moco-Domäne sollte durch verschiedenste Methoden eine mögliche Interaktion mit einem physiologischen Elektronen-Akzeptor gezeigt und dieser identifiziert und charakterisiert werden.

Neben einem Two-Hybrid-Screen in *Saccharomyces cerevisiae* (Kap. 2.10.1), wurde eine Immuno-Affinitätschromatographie (Affi-Gel 10, BioRad) (Kap. 2.10.2) zur Identifikation eines Interaktionspartners eingesetzt.

### **2.10.1 Einsatz des pflanzlichen Gens *At-sox* im Two-Hybrid-Screen einer *A. thaliana* cDNA-Bank**

Das Two-Hybrid-System ist ein in Hefe durchgeführter genetischer Assay zur Detektion von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen. Dabei erlaubt ein positives Ergebnis die schnelle Identifizierung von Genen, deren Genprodukte mit dem jeweiligen Zielprotein interagieren. Das System beruht auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsaktivatoren aus zwei physikalisch trennbaren, modulartigen Domänen bestehen. Abb. 2.32 zeigt schematisch die Funktionsweise des Two-Hybrid-Systems.



**Abb. 2.32: Schematische Darstellung des Two-Hybrid-Funktionsprinzips.**

Zur Identifikation der mit der At-SOX interagierenden Proteine wurde die pflanzliche cDNA der *At-sox* unter Verwendung mutagenisierender Primer in den pGBKT7-„bait“-Vektor kloniert. Die Translation dieses Vektors ergab ein fusioniertes Zielprotein der At-SOX und der GAL4-Bindungsdomäne. Eine kommerziell erhältliche, in pGAD10 klonierte *A. thaliana* cDNA-Bank der Firma Clontech wurde amplifiziert ( $3,15 \times 10^6$  unabhängige Klone) und zur Detektion von Interaktionen eingesetzt. Die Transformation in den Hefestamm AH109 erfolgte nach Herstellervorschrift (MATCHMAKER III, Clontech). In einem 30-fachen „up-scale“ wurden beide Vektoren gleichzeitig im großen Maßstab kotransformiert. Der Transformationsansatz wurde in 200 µl-Aliquots auf insgesamt 100 Platten verschiedener Stringenzen ausplattiert. Auf 20 Platten wurde ausschließlich auf die Aufhebung der Tryptophan- und Leucin-Auxotrophie (geringe Stringenz) selektiert. Ein sich nach 4 Tagen zeigender dichter Bewuchs deutete auf eine effiziente Transformationsrate hin. Eine Selektion von diesen Platten wurde aufgrund der erschwerten Vereinzelung nicht durchgeführt. Mit weiteren 40 Platten wurde der Screen bei höchster Stringenz vorgenommen. Auf diesen Platten wurde neben der erfolgten Transformation beider Vektoren (-Trp, -Leu), außerdem durch drei Reportergene (-His, -Ade, +α Gal), die Interaktion getestet. Allerdings konnte trotz mehrtägiger Inkubation kein Wachstum auf

diesen Platten erkannt werden. Erfolgreicher war die Selektion bei mittlerer Stringenz (-Trp, -Leu, -His) auf ebenfalls 40 Platten, bei der 138 positive Hefeklone identifiziert werden konnten. Nach der Subklonierung der 138 Hefeklone wurde dann nochmals auf höchster Stringenz selektiert, und es wurden 28 Klone erhalten. Zur Charakterisierung der interagierenden Proteine war eine Vereinzelung der in der Hefezelle vorhandenen heterogenen Plasmidpopulation notwendig. Hierzu hatten die eingesetzten Plasmide unterschiedliche Selektionsmarker für das Wachstum in *E. coli*. Einer Plasmid-Präparation aus den Hefezellen folgte nach erfolgreicher Transformation durch Elektroporation eine Amplifikation in *E. coli*. Dabei wurde mit Ampicillin auf den pGAD10-Vektor selektiert. Eine erste Überprüfung der positiven Interaktion durch Retransformation in die Hefe, die das Zielprotein bereits enthielt, wurde zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Tab. 2.3 zeigt die Auflistung der isolierten und identifizierten Proteine aus *A. thaliana*, die im Two-Hybrid-System eine Interaktion mit der At-SOX zeigten.

Von den 28 positiv-gescreenten Hefeklonen konnten 24 sequenziert werden und einer Datenbankanalyse unterzogen werden. Das in hoher Anzahl unabhängiger Klone (Anzahl 8) auftretende TH65-Protein ist als ein Motorprotein beschrieben, welches starke Affinitäten zu variablen Zielproteinen im Two-Hybrid-System besitzt (De Veylder, 1997). Ein direkter funktioneller Zusammenhang kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht erkannt werden. Im Gegensatz dazu wurde ein Protein isoliert, bei dem es sich um einen Spannungsabhängigen selektiven Anionen-Transporter handelt. Dieses Protein konnte durch zwei unabhängige Hefeklone identifiziert werden, und seine Lokalisation in der Peroxisomenmembran wurde in Datenbankanalysen mit ca. 80% angegeben. Die Interaktion mit deutlich im Kern lokalisierten Proteinen konnte durch eine Überprüfung mittels Retransformation als falsch-positives Signal verifiziert werden. Desweiteren konnten einzelne positive Hefeklone charakterisiert werden, die allerdings bis jetzt nur eine

Interaktion mit putativen Proteinen zeigten. Allerdings ist diesen möglichen Interaktionspartnern allen eine wahrscheinliche Lokalisation in Peroxisomen gemeinsam.

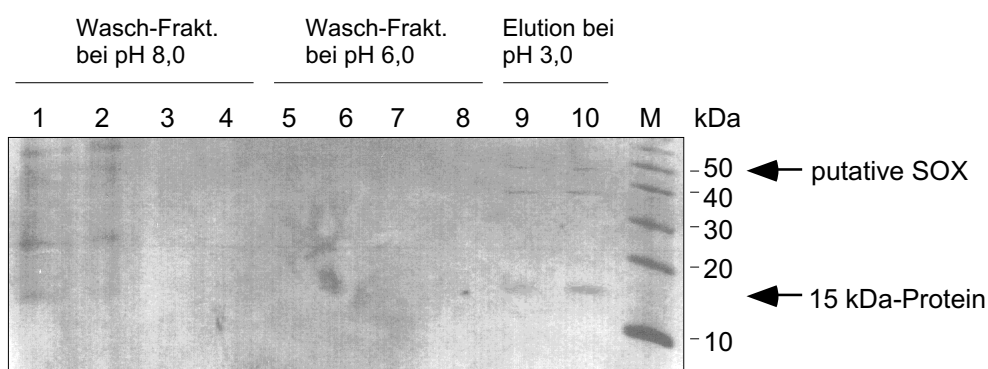
**Tab. 2.3: Auflistung einiger mit der At-SOX interagierender Klone aus *A. thaliana* und mögliche Funktionszuordnungen durch Homologievergleiche mit verwandten Proteinen.**

Homologie zu	Anzahl identischer unabhängiger Klone	postulierte Funktion	Postuliertes Lokalisations-signal	Postulierte Häm-Signatur	Molekulare Masse (kDa)
Th65	8	Motorprotein	?		44,1
Putative Xylanendohydrolase	2	Zuckerstoffwechsel	?	Ja	58,6
Voltage dependent anion selective channel protein	2	möglicher Sulfat-transporter	peroxisomale Membran		29,2
bHLH	2	Bindet G-Box-Sequenzen	Kern	Ja	67,9
Myrosinase-binding protein	1	?	peroxisomal möglich		50,1
Shock protein src2-homolog	1	?	ER		34,0
Putatives polypyrimidin tract binding protein	1	DNA-Bindung	Kern		43,6
Similar to ATP-Citrat-lyase	1	?	peroxisomal möglich		46,9
Cjun-aktivator-like protein	1	?	?		40,3
Putative RNA-Helicase	1	?	Kern		247,0



## 2.10.2 Immuno-Affinitätschromatographie der rAt-SOX

Eine Interaktion der pflanzlichen SOX mit einem Häm-Protein konnte durch den Two-Hybrid-Screen nicht eindeutig belegt werden. Daher kamen weitere Methoden zur Identifizierung einer möglichen Interaktion zum Einsatz. In einem ersten methodischen Ansatz sollte die rekombinante At-SOX an eine Affi-Gel 10-Matrix der Firma BioRad kovalent gekoppelt werden, und nach einer Inkubation mit Proteinrohextrakten aus *A. thaliana* sollten selektiv Interaktionspartner durch eine pH-Wert-Verschiebung eluiert werden. In Abb. 2.33 ist eine solche Aufarbeitung im silbergefärbten SDS-Gel gezeigt. In den Eluatfraktionen konnten insgesamt drei in verschiedenen Größen laufende Proteinbanden erkannt werden. Bei dem Protein, welches eine molekulare Masse von 45 kDa aufweist, könnte es sich um die endogene At-SOX, die sich im Rohextrakt befand, handeln. Eine Interaktion kann mit einer Bindung durch die Dimerisierungsdomäne erklärt werden.



**Abb. 2.33: Silberfärbung der Wasch- und Eluatfraktionen der Affigel 10 (BioRad)-Chromatographie eines 7,5%-igen Tricingels.** Aufgetragen sind jeweils 20 µl der erhaltenen Fraktionen. 1-4: jeweils 3 ml-Fraktionen gewaschen mit Puffer pH 8,0; 5-8: jeweils 3 ml-Fraktionen gewaschen mit Puffer pH 6,0; 9 und 10: 1 ml Eluatfraktionen durch pH-Senkung auf pH 3,0. M: 10kDa-Standard-Proteine.

Im Silbergel konnte außerdem noch ein etwa 15 kDa großes Protein in der Eluatfraktion detektiert werden. Dieses Protein könnte ein möglicher Interaktionspartner der At-SOX sein. Durch Datenbankrecherche konnte im Zuge des Arabidopsis-Genom-Projektes eine Sequenz identifiziert werden, die für ein Hämprotein des Cytochrom b<sub>5</sub>-Typs (Accession Nr.: 048845) kodiert. Dieser ORF auf Chromosom II kodiert für 134 Aminosäuren, was einem Protein von 15 kDa entspricht. Die putative Funktion wird als Elektronen-Carrier von membrangebundenen Oxygenasen beschrieben. Eine Reinigung von erhöhter Menge des putativen Häm-Proteins aus *A. thaliana*, war innerhalb dieser Arbeit nicht möglich. Desweiteren konnte die Übertragung von Elektronen von der Moco-Domäne der At-SOX auf diesen putativen Interaktionspartner nicht gezeigt werden.

Abschließend ist zu bemerken, dass die durchgeführten Methoden zur Identifikation eines akzessorischen Proteins an der At-SOX keinen eindeutigen Hinweis auf einen physiologischen Elektronenakzeptor erbrachten. Allerdings konnte durch die Isolierung eines putativen Sulfat-Transporters im Two-Hybrid-Screen und durch die Identifikation eines putativen Häm-Proteins des Cytochrom b<sub>5</sub>-Typs erste funktionelle Hinweise gesammelt werden, die das Wirken der pflanzlichen SOX verdeutlichen können.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Identifikation und Charakterisierung eines Gens für eine pflanzliche Sulfitoxidase (*At-sox*)

Grundlage der Identifikation einer pflanzlichen Sulfitoxidase aus *A. thaliana* bildete die Homologie eines Arabidopsis ESTs zur tierischen Sulfitoxidase aus *G. gallus*. Durch die molekularen Studien innerhalb dieser Arbeit konnte eine cDNA aus *A. thaliana* isoliert werden, die hohe Homologien zu tierischen Sulfitoxidasen aufwies. Die Sequenzierung ergab einen offenen Leserahmen von 393 AS, der allerdings ausschließlich für eine SOX-spezifische Moco-Domäne kodiert. Die für tierische Sulfitoxidasen typische Häm-Domäne am N-Terminus fehlte bei der pflanzlichen Sequenz. Das Arabidopsis-Gen zeigte deutlich höhere Homologien zu den bekannten tierischen Sulfitoxidasen (47%) als zur Nitratreduktase aus *A. thaliana* (35%). Weiterführende Analysen der genomischen Struktur des Gens bestätigten diesen Sachverhalt. Im Rahmen des Arabidopsis-Genom-Projektes wurde eine 89,15 kB umfassende Region des BAC-Klons F28J7 (Accession Nr. ATAC010797) in die Datenbank eingespeist, die einen Vergleich mit der Sequenzierung von genomischen Phagenklonen aus *A. thaliana* zuließ. Dabei konnte eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen und der daraus entwickelten Exon/Intron-Struktur festgestellt werden. Die genomische Sequenz enthält insgesamt 11 Introns, wobei die Größen zwischen 67 bp (Intron 5) und 299 bp (Introns 9) schwanken. Die Exon-Intron-Übergänge entsprechen alle der allgemein gültigen GT-AG-Regel. Gleichzeitig konnte durch die Einspeisung der BAC-Klon-Sequenz eine Aussage über die Lokalisation des Gens der *At-sox* im Genom von *A. thaliana* getroffen werden, da die Lage des genomischen Klons auf Chromosom III in der Nähe des RI-Markers mi74b bei 5,8 cM festgelegt wurde.

Das sich in der Nähe befindliche Gen, welches Intron-frei für ein Häm-Protein des Cytochrom P450 Typs kodiert, erweckte bei der Suche nach möglichen Interaktionspartnern besonderes Interesse. Erstmals wurden 1964 die Cytochrom P450-Hämproteine als Cytochrome des b-Typs identifiziert, die nach der Bindung von Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufwiesen (Omura & Sato, 1964). Diese Beobachtung führte zu dem heute gebräuchlichen Namen Cytochrom P (Pigment) 450 (Absorptions-maximum bei gebundenem Kohlenmonoxid). 1970 gelang erstmalig die Reinigung und Rekonstitution eines eukaryotischen Cytochrom P450 aus Mikrosomen der Leber von Ratten (Lu *et al.*, 1970). Mittlerweile umfasst das Cytochrom P450-System rund 300 verschiedene Isoformen, denen mindestens 114 Genunterfamilien zugeordnet werden können. Das in Prokaryoten als lösliches Protein vorliegende Enzym ist in Eukaryoten (Stegemann and Hahn, 1994) über den N-Terminus in der Membran verankert. Die Hämgruppe ist parallel oder senkrecht zur mikrosomalen Membranoberfläche orientiert (Tretiakov *et al.*, 1989) und ist so in der Lage, mit elektronenliefernden Proteinen zu interagieren. Zu den endogenen physiologischen Funktionen des Cytochrom P450-Systems gehört, neben der Synthese und Degradation von Steroidhormonen, auch die Metabolisierung von Peroxisomenproliferatoren (Okey, 1990). Das für ein Cytochrom P450 kodierende Gen in der direkten Umgebung der *At-sox* könnte auf einen physiologischen Zusammenhang dieser beiden Proteine hindeuten, da das Cytochrom P450 unter gewissen Umständen in der Lage sein könnte, die Elektronen-Übertragung zu übernehmen. Allerdings ist die Koregulation auf Transkriptionsebene in Eukaryoten eher unüblich und es bestehen nur vage Vorstellungen. Die Datenbankanalyse der *At-SOX*-Aminosäuresequenz auf mögliche charakteristische Sequenzmotive und/oder posttrans-lationale Modifikationsstellen identifizierte mit einer Homologie von 86% eindeutig ein Molybdopterin-Oxidoreduktase-Sequenzmotiv. Eine Regulation der Enzymaktivität durch reversible Übertragung einer  $\gamma$ -Phosphatgruppe durch verschiedene Kinasen könnte an den verschiedensten Phosphorylierungsstellen mit unterschiedlichster Kinasespezifizierung

möglich sein. Eine solche posttranslationale Regulation durch Phosphorylierung konnte für ein anderes pflanzliches Molybdoenzym, die Nitratreduktase, beschrieben werden (Crawford *et al.*, 1996).

Die Eintritts- und Zielsteuerungssequenz für viele peroxisomale Proteine besteht aus dem Tripeptid Ser-Lys-Leu (SKL = PTS1), das sich am C-Terminus der Proteine befindet und nicht abgespalten wird. Es gibt jedoch noch andere Sequenzen für die Zielsteuerung von Proteinen in die Peroxisomen. So beschrieben De Hoop und Ab (1993) eine weitere Targeting-Signalsequenz (RL/I-X<sub>5</sub>-H/QL = PTS2), die am N-Terminus lokalisiert ist. In höheren Eukaryoten (Pflanzen und Tieren) ist die PTS2-Sequenz innerhalb einer N-terminalen Präsequenz lokalisiert, die abgespalten wird. Wohingegen in niederen Eukaryoten (Hefe) Beispiele für Proteintransporte in Peroxisomen bekannt sind, bei denen diese Sequenz nicht abgespalten wird.

Eine weiterführende Datenbankanalyse (<http://www.expasy.ch/tools/psort>) der Proteinsequenz bezüglich solcher putativer Targeting-Signalsequenzen ergab eine hohe Homologie zur beschriebenen SKL-Peroxisomen-Signalsequenz (Gietl, 1996). Auch für die PTS2-Signalsequenz konnte innerhalb der At-SOX-Proteinabfolge eine Konsensus-Sequenz ermittelt werden, allerdings lag diese Aminosäureabfolge nicht am N-Terminus. Vielmehr würde eine Abspaltung dieser Sequenz vom Protein auch das aktive Zentrum stark beeinträchtigen und kann so klar als möglicher Kandidat einer Zielsteuerung ausgeschlossen werden.

### 3.2 Biochemische Eigenschaften des in *E. coli* rekombinant-exprimierten At-SOX-Proteins

Die erste identifizierte Sequenz für eine pflanzliche SOX sollte genutzt werden, um die biochemischen Eigenschaften zu charakterisieren und enzymologische Studien durchführen zu können. Hierzu wurde das Protein im prokaryotischen System überexprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt.

#### 3.2.1 Expression und chromatographische Reinigung

Zur biochemischen Charakterisierung der pflanzlichen Sulfitoxidase aus *A. thaliana* wurde das Protein im prokaryotischen Expressionssystem in *E. coli* überexprimiert und über eine C-terminale Extension von sechs Histidinen chromatographisch an Ni-NTA-Matrix gereinigt. Für vergleichende biochemische und funktionelle Experimente wurde die SOX aus *Mus musculus* in gleicher Weise über eine N-terminale Histidin-Markierung gereinigt.

Zunächst zeigte sich, dass eine Reinigung mittels C-terminalen His-tag nicht, bzw. nur in sehr geringer Menge möglich war. Grund hierfür könnten hydrophobe Aminosäuren am C-Terminus spielen, die eine korrekte Positionierung der Histidine verhinderten. Spätere Reinigungen der N-terminal-markierten At-SOX wiesen nur noch sehr geringe Mengen an At-SOX-Protein im Säulendurchfluß auf, was auf eine verbesserte Bindung des Proteins an die Ni-NTA-Matrix hindeutete. Desweiteren konnten so etwa 20-fach höhere Proteinmengen bei der anschließenden Imidazol-Elution erzielt werden.

Da es sich bei der At-SOX um ein eukaryotisches biosynthetisches Protein handelt, könnten fehlende bzw. unterrepräsentierte Substrate und/oder Interaktionspartner die Faltung und damit die Löslichkeit beeinflussen. Eine divergente Codon-Benutzung kann wegen der starken Expression des Proteins ausgeschlossen werden. Durch die Erniedrigung der

Expressionstemperatur auf 25°C und einer eingestellten Zelldichte vor der Induktion auf weniger als  $OD_{600} = 0,1$ , konnte die Löslichkeit des Proteins im prokaryotischen Expressionssystem gesteigert werden. Die rAt-SOX und die rMm-SOX waren nach Expressionsoptimierung im mg-Bereich unter nicht-denaturierenden Bedingungen zu reinigen. Jedoch zeigte sich früh, dass das aufgereinigte Protein nur relativ wenig Enzymaktivität aufwies, was nach HPLC-FormA-Analyse auf eine geringe Saturierung (etwa 15-20%) durch die prostetische Gruppe des Molybdänkofaktors zurückzuführen war. Eine Erhöhung der Saturierung auf 80% konnte durch die Expression in der Moco-Biosynthese-Mutante TP1000 von *E. coli* erreicht werden (Temple & Rajagopalan, 2000). Desweiteren wurde dem Kulturmedium während der Überexpression 1 mM Molybdän in unphysiologisch hoher Konzentration zugesetzt. Die gesteigerte Konzentration an Moco-saturiertem Protein konnte durch die enzymologischen Untersuchungen und spektroskopischen Studien bestätigt werden.

Die Kultivierung der Expressionskultur bei einer niedrigen Temperatur von 18°C zeigte in neueren Arbeiten eine interessante Degradation der At-SOX (persoenliche Mitteilung K. Fischer). Es konnten zwei Degradationsprodukte der Molekulargroessen von 27 kDa und 16 kDa von der Ni-NTA-Saeule eluiert werden. Dabei zeigte ein UV/vis-Spektrum, dass der Moco in hoher Saturierung an dem 27 kDa-Protein gebunden vorlag. Bei den beiden Degradationsprodukten handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit um die beiden Subdomaenen der Moco-Domaene. Für die Moco-bindende Domaene kann eine kalkulierte Größe von 27 kDa berechnet werden. Für die Dimerisierungsdomaene kann eine Größe von 16 kDa angenommen werden. Diese Ergebnisse könnten die von Ganai *et al.*, (1997) durchgeführten Reinigungen eines 27 kDa-Proteins aus *Malva silvestris* mit SOX-Aktivität erklären. Eine Degradation des gesamten pflanzlichen SOX-Proteins während der Reinigung scheint möglich zu sein.

### 3.2.2 Bestimmung der apparenten molekularen Masse

Durch Gelfiltration an einer Superdex 200-Säule (Pharmacia) wurde die apparente molekulare Masse der auf > 95% gereinigten rAt-SOX und die in Lösung vorliegenden Multimerformen bestimmt. Dabei zeigte das rAt-SOX-Protein ein dominantes Auftreten von Monomeren (ca. 90%) und einen nur geringen Anteil an Dimeren. Immunologische Analysen der Fraktionen der Gelfiltration zeigten trotz denaturierender Bedingungen im SDS-Gel neben den positiven Antikörpersignalen bei 45 kDa, was der monomeren Form entspricht, auch ein positives Antikörpersignal bei etwa 90 kDa. So kann davon ausgegangen werden, dass sich in der Eluatfraktion der monomeren Form bei den gegebenen Salzbedingungen erneut ein Verhältnis von etwa 9 : 1 zwischen Monomer und Dimer einstellt. Die Bindung zu einer dimeren Form scheint sehr stabil zu sein, da sie trotz Denaturierung nicht völlig aufgeschlossen werden konnte und so ein Signal bei 90 kDa im immunologischen Nachweis erhalten werden konnte. Eine Messung der Sulfit-abhängigen Ferricyanid-Reduktase-Aktivität in den einzelnen Eluatfraktionen der Gelfiltration ergab, dass die Aktivität in den Fraktionen der monomeren Form der rAt-SOX detektierbar war. Dies läßt jedoch nicht die Schlußfolgerung zu, dass ausschließlich das Monomer der rAt-SOX Enzymaktivität zeigt. Zum einen handelt es sich bei Ferricyanid nicht um den physiologischen Elektronenakzeptor, und zum anderen, wie bereits oben beschrieben, stellt sich in der Eluatfraktion der Gelfiltration sehr schnell ein stabiles Verhältnis zwischen Dimer und Monomer ein.



### 3.3 Native Reinigung der Sulfitoxidase aus *N. tabacum* (Nt-SOX)

Die Reinigung einer nativen SOX ermöglichte den Vergleich mit dem rekombinant überexprimierten rAt-SOX-Protein und konnte so Rückschlüsse auf eventuell auftretende Artefakte innerhalb der prokaryotischen Überexpression liefern. Weiterhin zeigten die Datenbankanalysen mehrere, putative posttranslationale Modifikationsstellen innerhalb der AS-Sequenz, so dass auch die veränderte Regulation durch beispielsweise reversible Phosphorylierungen in der eukaryotischen Zelle eine Betrachtung wert sein mußte.

Die native Reinigung einer pflanzlichen SOX wurde mit Blattmaterial von *N. tabacum* durchgeführt. Dies erfolgte, da eine Aufarbeitung aus Pflanzenmaterial von *A. thaliana* sehr viel weniger Ausgangsmaterial zur Folge gehabt hätte und so die Menge an aufzureinigendem SOX-Protein erhöht werden konnte. Desweiteren zeigte sich, dass sich durch die Extraktion von Gesamtprotein aus ausgewachsenen Blättern deutlich mehr SOX-Protein aufreinigen ließ, als beispielsweise aus Suspensionskulturen von *N. tabacum*. Die Reinigung konnte jedoch problemlos mit dem Antikörper gegen die rAt-SOX verfolgt werden, da eine Detektion der kreuzreagierenden Nt-SOX möglich ist. Es reichten zwei Reinigungsschritte aus, um das Enzym in einer Reinheit von etwa 95% vorliegen zu haben. Bei dem ersten Anreinigungsschritt über eine Anionenaustauschermatrix (SourceQ30, AP Biotech) konnten durch eine immunologische Analyse der Reinigungsfractionen kreuzreagierende Proteinbanden unterschiedlicher Größe detektiert werden. Das Signal im pflanzlichen Rohextrakt und im Säulendurchfluß korrespondiert mit der monomeren Form des Enzyms. Da es auch im Säulendurchfluß beobachtet werden kann, ist eine Bindung an eine Anionenaustauschermatrix bei einem pH-Wert von 7,3 für die monomere Form der SOX nicht möglich. In einer der Eluatfraktionen (Frakt. 6) konnte zusätzlich eine Proteinbande, die für das Dimer reagiert, gezeigt werden. Eine Messung der Enzymaktivität mittels Ferricyanid erwies sich zunächst als äußerst schwierig. Die für die tierische SOX beschriebene und in

dieser Arbeit auch für die rAt-SOX gezeigte Inhibition der Aktivität bei erhöhten Konzentrationen an Salz könnte ein Grund dafür sein. Zumindest ließ sich nach Umpufferung der salzhaltigen Proteinfractionen in den Assay-Puffer SOX-Aktivität nachweisen. Diese beschränkte sich allerdings auf die Rohextrakt- und Eluatfraktion. Eine Aktivität im Säulendurchfluß konnte nicht beobachtet werden. Die konzentrierte Eluatfraktion wurde im zweiten Anreicherungsschritt über eine Gelfiltrationssäule separiert. Hierbei zeigte sich eine distinkte Retention von der Superdex 200-Säule. Ein sich anschließender immunologischer Nachweis zeigte sowohl das Dimer als auch das Monomer der Nt-SOX. Die Enzymaktivität konnte jedoch nicht eindeutig auf das Dimer und/oder Monomer festgelegt werden, da hierfür die Retentionsvolumen zu eng aneinander lagen. Beim dritten Reinigungsschritt, wiederum über eine Anionenaustauschermatrix (Bioscale Q1), konnte eine Auftrennung des SOX-Protein-Pools, wie sie bereits bei der ersten Anionenaustauscher-Chromatographie mittels der SourceQ30-Matrix beobachtet werden konnte, gezeigt werden. Im Säulendurchfluß eluierte nicht-aktives SOX-Protein, bei dem auch kein MPT nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz hierzu konnte sowohl die Enzymaktivität, als auch MPT im, durch einen Salzgradienten eluierten, SOX-Protein ermittelt werden. Eine abschließende Silberfärbung zeigte, dass sich in der angereinigten Proteinfraction nur noch Nt-SOX-Protein befand. Dieser Sachverhalt wurde durch die Bestimmung der Aminosäureabfolge mittels N-terminaler Proteinsequenzierung und durch die Messung von Sulfit-abhängiger Enzymaktivität bestätigt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der nativen Reinigung kann zur Zeit angenommen werden, dass die SOX in einem Pool von sowohl aktivem Holoprotein und inaktivem Apoprotein vorliegt. Die Inkorporation der prosthetischen Gruppe des Moco könnte das veränderte Bindungsverhalten an die Anionenaustauschermatrices erklären. Durch die Bestimmung sehr unterschiedlicher isoelektrischer Punkte, könnte das variierende Bindungsverhalten des Holo- bzw. Apoproteins vermutet werden. Denkbar ist ein Reinigungsartefakt, der zu einer Separierung des Enzympools führt. Dies würde jedoch

ebenfalls eine sehr variable Bindung des Moco voraussetzen. Die *nit-1* Rekonstitutionsexperimente mit der rAt-SOX bestätigten eine solche schwache Bindung an das Apoprotein. Da eine Rekonstitution des *N. crassa* NR-Apoproteins durch endogenen Zusatz von Moco, der ursprünglich aus der rAt-SOX stammte, ohne vorherige Denaturierung möglich war.

### **3.4        Enzymologische und spektroskopische Charakterisierung der pflanzlichen Sulfitoxidasen rAt-SOX und Nt-SOX**

Die Analysen der cDNA-Sequenz der At-sox und der genomischen Struktur des Gens zeigten die Abwesenheit einer im Vergleich zur tierischen SOX am N-Terminus liegenden Häm-Domäne des b<sub>5</sub>-Typs. Durch enzymologische und spektroskopische Charakterisierungen der rAt-SOX im Vergleich zur nativ-gereinigten Nt-SOX sollte das Fehlen der Häm-Gruppe auch biochemisch bestätigt werden.

Trotz der deutlich höheren Homologie der pflanzlichen At-SOX zu tierischen Sulfitoxidasen als zum nächsten Molybdoenzym des gleichen Organismus der Nitratreduktase, wurde das exprimierte Enzym auf Nitratreduktase-Aktivität getestet. In einem standardisierten Assay mit Benzylviologen als Substrat konnte keine derartige Enzymaktivität gemessen werden. So wurde die Annahme eines eventuell rudimentären Vorkommens eines nur die Moco-Domäne umfassenden Molybdoenzyms mit NR-Restaktivität durch diesen enzymologischen Sachverhalt verworfen.

Das UV/vis-Spektrum der rekombinant exprimierten rAt-SOX bestätigte die molekularbiologischen Hinweise auf ein Fehlen der für die tierische SOX typischen Häm-Domäne. Die signifikante Absorption der Häm-Gruppe bei 414 nm konnte für die rAt-SOX eindeutig nicht gezeigt werden. Wohingegen die zum Vergleich ebenfalls rekombinant exprimierte rMm-SOX (*Mus musculus*) sowohl eine hohe Absorption bei 414 nm, als auch die typische

Verschiebung zu 424 nm durch Reduzierung durch Sulfid zeigte. Die Präsenz einer Hämgruppe wurde bereits bei der Kultivierung und späteren Reinigung mit bloßem Auge sichtbar, da bereits die Kultur und die Proteinlösung stark rot gefärbt war. Das UV/vis-Spektrum der rAt-SOX zeigte jedoch eine bedeutend geringere Absorption bei etwa 355 nm, als das veröffentlichte Spektrum von Johnson & Rajagopalan (1977) einer isolierten Moco-Domäne, die durch tryptischen Verdau der SOX aus *G. gallus* erhalten wurde. Die Verringerung der Absorption bei 355 nm durch die Reduktion des Enzyms konnte den Cystein-Molybdat und Dithiolen-Molybdat-Bindungen zugeordnet werden (Garton & Rajagopalan, 1997). Sie konnte auch für das rAt-SOX-Protein nachgewiesen werden.

Die durchgeführten EPR-Studien des rAt-SOX-Proteins konnten nähere Einzelheiten der chemischen Natur des Molybdän-Zentrums aufdecken. Das Auftreten verschiedenster  $\text{Mo}^{\text{V}}$ -Signale reflektiert die Sensitivität des Zentrums zu seiner Umgebung. Das Spektrum bei pH 10,0 zeigte die mit der SOX aus *G. Gallus* vergleichbaren g-Werte. Die charakteristische Verschiebung der g-Werte und das Auftreten von „hyperfine-splitting“-Signalen bei der SOX aus *G. gallus* bei niedrig pH (pH 6,0), zeigt einen signifikanten Wechsel in der Molybdän-Koordination bei steigendem pH. Der prinzipielle Unterschied zwischen den beiden  $\text{Mo}^{\text{V}}$ -Species ist die Anwesenheit einer Anionenbindungsstelle, bei niedrigem pH-Wert. Diese Bindungsstelle fehlt oder hat deutlich geringere Affinität bei höherem pH-Wert (Bray *et al.*, 1983). Diese für die SOX aus *G. Gallus* beobachteten Charakteristika konnten bei der rAt-SOX nicht beobachtet werden. Die rAt-SOX zeigt, bei einer EPR-Spektroskopie unter Niedrig-pH-Bedingungen, vielmehr eine Vermischung eines für die tierischen SOX typischen Spektrums bei pH 6,0 und eines Spektrums unter Anwesenheit von Phosphationen. Dies spricht für eine verschiedenartige Substratbindung am aktiven Zentrum der At-SOX, durch veränderte Bindungskonstanten. Dieses veränderte Verhalten bei der EPR-Spektroskopie konnte bereits bei einer identifizierten SOX aus *Thiobacillus novellus* beobachtet werden

(Kappler *et al.*, 2000). Auch hier wurde auf ein, im Vergleich zur tierischen SOX verändertes Bindungsverhalten, innerhalb des aktiven Zentrums geschlossen.

Durch das nachgewiesene Mo<sup>V</sup>-Signal bei einem pH-Wert von 10,0 kann das rAt-SOX-Protein jedoch eindeutig biochemisch zu den Sulfitoxidasen zugeordnet werden. Zumal erst durch die Enzymreduktion mit Sulfit die Mo<sup>V</sup>-Specie beobachtet werden kann. Neben den enzymkinetischen Messungen war so, durch die EPR-Spektroskopie, ein weiterer biochemischer Beweis erbracht, welcher das exprimierte Protein eindeutig in die Klasse der Sulfitoxidasen und nicht in die andere Klasse der großen Familie der mononuklearen Dioxo-Mo-Hydroxylasen, der assimilatorischen Nitratreduktase, einordnete.

Wie durch die Ableitung der AS-Sequenz und durch die Ergebnisse der UV/vis-Spektroskopie erwartet, konnte keine Sulfit-abhängige Enzymaktivität mit dem Cytochrom c-Assay gemessen werden. Ausschließlich die rMm-SOX zeigte vergleichbar gute Aktivität. Daher wurden die unphysiologischen Elektronenakzeptoren Ferricyanid und Ferricenium-hexafluorophosphat zur Bestimmung der enzymkinetischen Daten verwendet. Bei der Ermittlung der charakteristischen Enzymparameter konnte ein gleicher proteinvermittelter Umsatz an Sulfit durch die pflanzliche SOX (rAt-SOX und Nt-SOX) gezeigt werden. Desweiteren konnte die postulierte Inhibition durch Salze und andere Komponenten bestätigt werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Enzymkinetik der pflanzlichen SOX sehr ähnlich zu den kinetischen Bedingungen der tierischen SOXs verhält.

Der Versuch eine aktive chimäre SOX aus der Häm-Gruppe der SOX aus *R. norvegicus* und der pflanzlichen SOX-Moco-Domäne zu generieren, blieb erfolglos. Das Fusionsprotein zeigte zwar eine auf die Moco-Domäne beschränkte Aktivität der Ferricyanid-Reduktion, aber nicht die erwünschte Cytochrom c-Reduktase-Aktivität. Dies deutet auf eine besonders wichtige Funktion des Linkerbereiches zwischen Häm- und Moco-Gruppe hin. Durch die Modifikation des Linkers könnte sich die Variabilität der beiden während der Reaktion zwangsläufig korrespondierenden Domänen stark erhöhen und eine Übertragung der

überschüssigen Elektronen unmöglich machen (Enemark, 1999). Eine Beteiligung des Linkerbereiches an dem Elektronentransfer von der Moco-Domäne zur Häm-Domäne wird desweiteren durch die Studien von Cohen & Rajagopalan (1977) klar. Sie zeigten keine Cytochrom c-Reduktase-Aktivität von zuvor tryptisch verdauter und später coinkubierter Häm- und Moco-Domäne der SOX aus *G. gallus*. Experimente mit der chimären SOX, in denen aus diesem Grund die Viskosität des Reaktionsansatzes erhöht wurde, schlugen jedoch auch fehl.

Durch die Klonierung, Expression und Reinigung einer SOX aus *Mus musculus* (rMm-SOX) stand ein brauchbares Referenzsystem für eine tierische SOX zur Verfügung, auf welches zurückgegriffen werden konnte. Die rMm-SOX verhielt sich in den spektroskopischen und enzymkinetischen Messungen gleich zu den bekannten Daten der tierischen SOX. Das UV/vis-Spektrum wird durch die Häm-Gruppe des Proteins dominiert. Bei der EPR-Spektroskopie zeigt die rMm-SOX das typische Spektrum bei einem pH-Wert von 10,0. Auch die Verschiebung der g-Werte und das Auftreten von „Hyperfine-splitting“-Signalen bei einem pH-Wert von 6,0, sowie die Inhibition durch Phosphationen konnte nachgewiesen werden. Die für die rMm-SOX ermittelten Enzymparameter ( $k_M = 42,7 \mu\text{M}$  Sulfit) im Cytochrom c-Assay lagen im gleichen Bereich, wie die publizierten Werte ( $33 \mu\text{M}$ ) für die SOX aus *G. gallus* (Brody & Hille, 1996). Innerhalb dieser Arbeit wurde die rMm-SOX als Referenzsystem für eine tierische SOX genutzt. Allerdings könnte sie auch noch anderweitigen Nutzen haben. Die Expression der rMm-SOX in einer Moco-defizienten *E. coli*-Mutante (Bsp. MJ7 *chlN*) könnte Grundlage für die Etablierung eines Rekonstitutionsassays sein, der neben dem *nit-1*-Assay zur Identifizierung von Molybdäncofaktor genutzt werden könnte.

Durch die enzymologische und spektroskopische Charakterisierung der rAt-SOX und Nt-SOX innerhalb dieser Arbeit, kann eindeutig die Enzymaktivität einer SOX in Pflanzen nachgewiesen werden. Die Enzymfunktion zum nächsten in Pflanzen sehr gut untersuchten

Molybdoenzym, der Nitratreduktase, wurde sowohl durch die enzymatischen, als auch spektroskopischen Ergebnisse klar voneinander getrennt. Ähnlichkeiten zu der identifizierten bakteriellen SOX aus *T. novellus* konnte durch die EPR-Spektroskopie entdeckt werden. So scheint sich das Bindungsverhalten innerhalb des aktiven Zentrums bei der pflanzlichen SOX und bakteriellen SOX deutlich von den tierischen SOX zu unterscheiden. Dies rückt die bakteriellen und pflanzlichen SOX phylogenetisch enger zusammen. Dies wird durch die Identifikation bakterieller putativer SOX aus *Aeropyrum pernix* (Accession Nr. B72760) und aus *Aquifex aeolicus* (Accession Nr. AAC07069) noch bestärkt, da diese putativen Proteine als Molybdo-Oxidoreduktasen ohne Häm-Domäne identifiziert werden können

### 3.5 Lokalisation der pflanzlichen SOX

Die Identifizierung einer putativen PTS1-Sequenz erbrachte eine erste Vermutung für die Lokalisation der pflanzlichen SOX. Durch die durchgeführten immunologischen Nachweise mit dem generierten polyklonalen Antikörper konnte das At-SOX-Protein ausschließlich in der mitochondrial/peroxisomalen Organellenfraktion detektiert werden. Weder in der plastidären, noch in der cytoplasmatischen Proteinfraction wurde ein mit dem Antikörper reagierendes Signal detektiert. Ein methodisches Problem bei der Reinigung ließ lange die Frage offen, ob das aktive Enzym nun wie die tierischen Vertreter ebenfalls im Intermembranraum der Mitochondrien, oder über das PTS1-Signal in Peroxisomen lokalisiert ist. Die absolute Trennung von Peroxisomen und Mitochondrien wurde durch die Zellorganellenfraktionierung nie völlig erreicht. Eine weiterführende Aufreinigung über einen Saccharose-Gradienten lieferte jedoch zufriedenstellende Ergebnisse. Es wurde ein signifikantes Antikörpersignal in einer Molekulargröße von 43 kDa in der peroxisomalen Fraktion erkennbar. So scheint sich der Wirkungsort des pflanzlichen Enzyms von dem der tierischen Sulfitoxidasen zu unterscheiden.

Dieser erste experimentelle Hinweis wurde später durch Immunogold-Markierungs-Arbeiten bestätigt (persönliche Mitteilung C. Witt). Die Markierung mit Goldkügelchen konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eindeutig den Peroxisomen zugeordnet werden (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Dünnschicht aus einer Mesophyllzelle aus *A. thaliana* zur Immunolokalisation der At-SOX.** Als primärer Antikörper wurde der affinitätschromatographisch gereinigte polyklonale Ak gegen die rAt-SOX eingesetzt. Der sekundäre Ak wurde mit 10 µm-Goldkügelchen markiert und so detektiert. Deutlich wird die signifikante Markierung ausschließlich in Peroxisomen. C = Chloroplast, P = Peroxisomen, M = Mitochondrien.

Hierbei wurden die Peroxisomen durch das Auftreten einer dichten Proteinkristallstruktur (Katalase-Kristall) identifiziert. Die Arbeiten mit zwei verschiedenen Antikörpern festigte die Ergebnisse. Der erste polyklonale Antikörper gegen die At-SOX wurde mit 5 µm-großen Goldkugeln markiert und der zweite monoklonale Antikörper gegen die Katalase mit 10µm-großen Goldkugeln. Die sich anschließende elektronenmikroskopische Studie verschiedenster Präparationen zeigte eine Colokalisation der beiden Antikörper in den Peroxisomen (persönliche Mitteilung C. Witt). Eine Membranständigkeit der At-SOX, wie sie durch die Sedimentationsversuche von peroxisomaler Proteinfraction vermuten lässt, konnte jedoch



durch die Elektronenmikroskopie nicht bestätigt werden. Vielmehr liegen hier die Antikörpersignale verstreut im gesamten Lumen der Peroxisomen vor.

Aufgrund der Identifikation einer Consensus-Signalsequenz für Peroxisomen (Gietl, 1996) und der weiteren experimentellen Ergebnisse kann heute von einer Lokalisation der pflanzlichen SOX in den Peroxisomen ausgegangen werden. Dies kann ein erster Hinweis auf eine zu den tierischen SOXs veränderte Funktion sein.

Bei den Peroxisomen handelt es sich um 0,3-1,5 µm große Vesikel mit dichtem Inhalt, die spezielle Stoffwechselleistungen erbringen und so entsprechende Enzyme häufig in sehr hohen Konzentrationen enthalten. Die Funktion ist von Gewebe zu Gewebe sehr variabel. Sie können jedoch als oxidative Stoffumwandlungen, meistens im Sinne eines Abbaus, zusammengefaßt werden. Dabei steht Sauerstoff über die Vermittlung Flavin-haltiger Oxidasen als Akzeptor für Elektronen aus oxidierten organischen Substraten zur Verfügung. Allen Reaktionen ist die Entstehung des Zellgiftes Wasserstoffperoxid gemeinsam. Die namensgebende Peroxidase Katalase spaltet das  $H_2O_2$  in Wasser und Sauerstoff. In Pflanzen liegen Peroxisomen vor allem in photosynthetisch aktiven Zellen (Blatt-Peroxisomen) und in ölspeichernden Samen (Glyoxysomen) vor. Die Membran der Peroxisomen stammt letztlich vom endoplasmatischen Reticulum, wohingegen charakteristische peroxisomale Enzyme an freien Polysomen synthetisiert werden und erst später über eine Transitsequenz vermittelt in das Lumen der Peroxisomen verlagert wird. Bei dem proteinogenen Inhalt handelt es sich um eine sehr dichte Matrix, die in ihrer Grundstruktur auch nach Lyse der Membran noch erhalten bleibt (persönliche Mitteilung Dr. S. Reumann).

### 3.6 Mögliche Interaktionspartner der pflanzlichen SOX

Aufgrund der molekularen und enzymologischen Studien dieser Arbeit konnte der Enzymaktivität der pflanzlichen SOX bisher kein physiologischer Elektronenakzeptor zugeordnet werden. Unter der Annahme, es handelt sich wie bei der tierischen SOX um Cytochrom c, muß eine Interaktion mit einem vermittelnden Hämprotein postuliert werden. Dies lag nahe, da eine solche Interaktion auch für die bakterielle DMSO-Reduktase aus *Rhodobacter spheroides* bekannt ist. Hier erhält die einzeln vorliegende Moco-Domäne Elektronen von einem Hämprotein des Cyt *c*<sub>554</sub>-Typs.

Erste Hinweise konnten durch die Reinigung von rekombinant exprimiertem rAt-SOX-Protein mittels „Batch“-Verfahren erhalten werden. Die stärker verunreinigten Eluatfraktionen dieser Reinigung zeigten Enzymaktivitäten im Cytochrom c-Assay. Durch genauere Analyse dieser Fraktionen könnte von einer Coreinigung eines bakteriellen Hämproteins ausgegangen werden.

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner wurde das Two-Hybrid-System angewandt. Hierbei wurden verschiedenste positive Klone identifiziert und die jeweiligen mit der At-SOX interagierenden cDNA-Abschnitte sequenziert und einer Datenbankanalyse unterzogen. Bei dem insgesamt achtmal unabhängig voneinander isolierten Protein TH65 handelt es sich um ein Motorprotein, welches schon häufiger in diversen beschriebenen Two-Hybrid-Screens als positives Signal einer Interaktion identifiziert wurde. Es kann daher von einem falsch-positiven Signal für eine Interaktion mit der At-SOX ausgegangen werden. Interessantere funktionelle Einblicke erbrachten die Identifikationen mit einem Protein, welches als ein spannungsabhängiges Ionenkanalprotein beschrieben ist. Dieser Kanal könnte die selektive Ausschleusung von Sulfat-Ionen, die durch den enzymatischen Umsatz der pflanzlichen SOX aus Sulfid entstehen, aus dem peroxisomalen Lumen ermöglichen. So wäre eine eventuell notwendige Kompartimentierung der Sulfidoxidation in Peroxisomen der Pflanze und eine

gleichzeitige Verfügbarkeit des entstandenen Produktes Sulfat für den pflanzlichen Metabolismus erklärt.

Die erfolgsversprechende Isolation eines Hämproteins, welches für die Übertragung der Elektronen von der Moco-Domäne zum physiologischen Elektronenakzeptor zuständig sein könnte, war nicht möglich. Allerdings konnten andere Proteine identifiziert werden, die sowohl in der peroxisomalen Membran liegen können als auch Häm-Domänen besitzen. Jedoch sind diesen Proteinen andere Stoffwechselfunktionen zugeordnet.

Ein Problem bei der Identifizierung möglicher Interaktionspartner mit der pflanzlichen SOX durch das Two-Hybrid-System könnte die Lokalisation solcher akzessorischen Proteine sein. Unter der Annahme, es handelt sich um ein Häm-Protein, so liegt eine Lokalisation in Membranen nahe. Solche Membranproteine können durch das verwendete Two-Hybrid-System jedoch sehr schwer isoliert werden. Desweiteren kann der Elektronentransfer häufig nur durch die Membranständigkeit vermittelt werden, so dass es schwierig sein kann, dieses *in vitro* durch brauchbare Enzymassays messen zu können.

Es liegt nahe, zur Zeit davon auszugehen, dass die pflanzliche SOX durch die physiologisch mögliche Abgabe von überschüssigen Elektronen an Sauerstoff recycelt wird. Diese Annahme wird durch die Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Sauerstoff in Peroxisomen bekräftigt und könnte ein erster funktioneller Hinweis auf die Kompartimentierung dieser Reaktion sein. Die sich unterscheidenden EPR-Spektren lassen nicht nur den Schluß eines veränderten Bindungsverhaltens an dem aktiven Zentrum zu, sondern auch die mögliche modifizierte „Ableitung“ von überschüssigen Elektronen auf andere physiologische Elektronenakzeptoren.

### 3.7 Die Funktion der pflanzlichen SOX

Sulfit ist ein stark reduzierendes Agents mit einem elektrochemischen Reduktionspotential von  $-0,454$  in einer wässrigen Lösung bei pH 7,0. Die Struktur wechselt in einer wässrigen Lösung zwischen vielen verschiedenen Formen. So führt eine Hydratation von Sulfit-Dianion, Bisulfit, Metabisulfit und  $\text{SO}_2$  schnell wieder zurück zu Sulfit. Als ein stark reduzierendes Molekül ist das nucleophile Sulfit in der Lage, auf verschiedenste Weise in organischen Geweben Schaden anzurichten. Der tierische Organismus muß daher die Menge an freiem Sulfit durch das Enzym der SOX sehr gründlich regulieren. Freies Sulfit kann auf verschiedenste Art und Weise in tierische Gewebe gelangen. Während die externen Gründe der Aufnahme von freiem Sulfit durch die  $\text{SO}_2$ -Luftverunreinigung, oder dem Einsatz von Sulfit in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel, starken Schwankungen unterlegen sein können, ist die Menge an freiwerdendem Sulfit durch die internen metabolischen Prozesse sehr konstant. Die Freisetzung des Schwefelatoms aus den Aminosäuren Cystein und Methionin als Sulfit repräsentiert den finalen Schritt in der Degradation dieser Aminosäuren, bzw. ihrer Umsetzung in andere Biomoleküle. Zusätzlich steuert der Abbau von Sulfoglycolipiden durch die Arylsulfatase A im zentralen Nervensystem zu einer Erhöhung des freien Sulfits in der Zelle bei. Für die Arylsulfatase A wurde die Katalyse der Spaltung einer  $\text{RO-SO}_3^-$ -Bindung mit Wasser gezeigt. Es entsteht neben ROH und  $\text{H}^+$  auch Sulfat, welches enzymatisch in Sulfit umgesetzt wird. Um den internen zellulären Gehalt an Sulfit zu regulieren, stehen den Organismen drei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen kann das entstehende Sulfit sofort wieder in neue schwefelhaltige Biomoleküle eingebaut werden. Während Bakterien und niedere Eukaryoten zum direkten Einbau von Sulfit oder Sulfat in Methionin und Cystein befähigt sind, ist der tierische Organismus dazu nicht in der Lage. Er kann mit Hilfe des Enzyms Galaktosyl-Ceramid-Sulfat-Transferase aus Sulfit oder Sulfat, welches in 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat

umgewandelt wird, Sulfoglycolipide synthetisieren. Der Reaktionsmechanismus für die Generierung dieses reaktiven Intermediats ist allerdings bis heute noch nicht verstanden. Zum anderen bleibt Tieren zur Kontrolle des zellulären Sulfitgehaltes die Exkretion des überschüssigen Sulfits durch den Urin. Allerdings konnten Studien belegen, dass im Urin von Ratten, denen eine einmalige Dosis an Sulfit von 400 mg Sulfit/kg Körpergewicht verabreicht wurde, keinerlei Sulfit nachweisbar war. Es muß also in irgendetwas anderes verstoffwechselt werden. Eine dritte Möglichkeit zur Regulierung des Sulfitgehaltes im tierischen Organismus lieferte die erstmals 1954 beschriebene SOX, die in den nachfolgenden Jahren erfolgreich aus Ratte, Kuh und Hund gereinigt werden konnte. Das Enzym bildet in seiner aktiven Form ein 110 kDa großes Homodimer, welches in jeder Untereinheit ein Häm und ein Molybdän-Zentrum enthält. Es ist im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert und prinzipiell in Geweben der Leber und Nieren, sowie in geringen Mengen im Herzen, gefunden wurden. Eine Induzierbarkeit der Proteinexpression durch steigende Mengen an Sulfit in der Zelle ist nicht zu beobachten. Weiterhin ist ein homologes Enzym in Bakterien der Art *Thiobacillus novellus* beschrieben wurden, welches bei einer Molekulargröße von 40 kDa ebenfalls ein Häm-Zentrum und ein Molybdän-Zentrum enthält (Kappler *et al.*, 2000).

Lange Zeit wurde die Existenz einer pflanzlichen SOX angezweifelt, da die katalysierte Reaktion der Sulfitoxidation der primären Schwefel-Assimilation entgegenwirken würde. Ähnlich wie es für den Stickstoff gilt, wird auch der Schwefel in der Regel in reduzierter Form in die organischen Verbindungen eingebaut. Da aber Schwefel praktisch ausschließlich als Sulfation aufgenommen werden kann, muß dieses zunächst bis zur Stufe des Sulfids reduziert werden. Zu einer solchen Reaktion sind nur Bakterien, Pilze und grüne Pflanzen befähigt, während tierische Organismen über die Nahrung ihren Bedarf an reduzierten Schwefelverbindungen decken müssen. Die Reaktion erfolgt in den grünen Pflanzenzellen überwiegend in den Chloroplasten, kann aber bei höheren Pflanzen auch in Wurzeln ablaufen. Das durch die Wurzel aufgenommene Sulfat gelangt via Xylem-Transport in die Sproßorgane.

Dort beginnt die Reaktionsfolge mit der Bildung von „aktiven Sulfat“, indem eine anhydridische Bindung von Sulfat an AMP zu einer energiereichen Bindung führt. Tierische Organismen sind zu einer solchen Aktivierung ebenfalls befähigt, allerdings nur zur Bildung von Sulfatestern, nicht zu einer weiteren Reduktion. Das aktivierte Sulfat wird auf ein Protein übertragen und ohne Auftreten freier Zwischenstufen über proteingebundenes Sulfit bis zur Stufe des Schwefelwasserstoffes reduziert. Dieser wird ebenfalls nicht freigesetzt, sondern reduktiv in O-Acetylserin eingebaut, wobei Cystein gebildet wird (Leustek, 1999). Von hier aus kann der Schwefel dann in andere Schwefelverbindungen (z.B. Methionin) überführt werden. Als Reduktionsmittel für die Reaktion in Chloroplasten dient Ferredoxin, welches, wie das benötigte ATP, aus der Lichtreaktion der Photosynthese stammt.

Trotz der divergenten Reaktion der S-Assimilation und einer möglichen Sulfitoxidation gab es bereits früh Hinweise auf eine solche Reaktion in höheren Pflanzen. Ballantyne beschrieb erstmals 1976 eine beobachtete Sulfitoxidation in mitochondrialen Fraktionen von *Pisum sativum*. Spätere Studien an Pflanzen, die mit SO<sub>2</sub>-Gas inkubiert wurden, deuteten ebenfalls auf eine solche Reoxidation von Sulfit zu Sulfat hin (zusammengefaßt Rennenberg & Herschbach, 1996). Desweiteren zeigte die Inkubation von isolierten Chloroplasten mit radioaktiv-markiertem Sulfit ein frühes Auftreten des umgesetzten Sulfats (Dittrich *et al.*, 1992). Die gezeigte Sulfitoxidation in intakten Chloroplasten wurde durch Licht verstärkt und war sensitiv gegen Inhibitoren der photosynthetischen Elektronentransportkette (Dittrich *et al.*, 1992; Jolivet *et al.*, 1995a). Sie wurde daher als eine primär nicht-enzymatische Reaktion während des Elektronentransports interpretiert. Eine weitere Studie beschreibt die Aufreinigung eines 27 kDa-Proteins aus *Malva silvestris* mit meßbarer SOX-Aktivität (Ganai *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun die Existenz einer pflanzlichen SOX eindeutig molekuklarbiologisch und biochemisch nachgewiesen werden. Durch diese Arbeit kann zur Zeit davon ausgegangen werden, daß es sich bei der pflanzlichen SOX, um das einzige

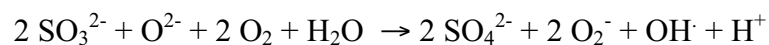
isolierte eukaryotische Molybdoenzym ohne weitere Redoxzentren handelt. Zu den bereits existierenden und gut charakterisierten drei Molybdoenzymen in Pflanzen: a.) die assimilatorische Nitratreduktase, b.) die Xanthindehydrogenase/oxidase und c.) die Aldehydoxidase kann die SOX als viertes Enzym dieser Klasse eingeordnet werden. Eine weite phylogenetische Verbreitung innerhalb des Pflanzenreiches konnte durch die generierten polyklonalen Antikörper gegen die At-SOX deutlich gemacht werden. Dabei zeigte sich in Vertretern der Monokotylen und Dikotylen sowie in krautigen und holzigen Pflanzen eine große Verbreitung (persönliche Mitteilung C. Witt). In ersten physiologischen Studien deutet sich eine Induzierbarkeit der Expression durch Cystein und Thiosulfat an (persönliche Mitteilung C. Witt). Auch für die aus *Thiobacillus novellus* isolierte SOX konnte eine signifikante Erhöhung der Enzymmenge bei Anwesenheit von Thiosulfat gezeigt werden (Kappler *et al.*, 2001). Die Induktion des Promotors auf Transkriptionsebene muß allerdings noch genauer untersucht werden.

Durch den hohen Schaden am Baumbestand in den achtziger Jahren intensivierten sich Studien zur SO<sub>2</sub>-Verschmutzung der Luft. Zusammengefaßt wurden die Ergebnisse zum Einfluß von SO<sub>2</sub> auf Pflanzen und seine Detoxifikation im pflanzlichen Metabolismus durch Heber & Hüve (1998). Während des letzten Jahrhunderts führte die voranschreitende Industrialisierung in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika zu einem rapiden Anstieg der SO<sub>2</sub>-Emission in der Luft (Stöckhardt, 1871). In Deutschland stieg sie im Jahre 1973 auf einen Höchststand von über  $3,8 \times 10^6$  t pro Jahr. Alarmiert durch das einsetzende Waldsterben wurden Maßnahmen ergriffen, die zu einem starken Rückgang der Luftverschmutzung führte und 1992 waren Werte der SO<sub>2</sub>-Emission von unter  $1 \times 10^6$  t pro Jahr erreicht (Elling, 1993). Die Anwesenheit von atmosphärischem SO<sub>2</sub> hat jedoch auch einen natürlichen und anthropogenen Ursprung. So werden durch Vulkanausbrüche jährlich durchschnittlich  $10\text{--}20 \times 10^6$  t freigesetzt. In der Atmosphäre oxidiert SO<sub>2</sub> in der Gasphase schnell (Anwesenheit etwa 25 h) mit Hydroxylradikalen (Calvert & Stockwell, 1983) und in

der wässrigen Phase mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Ozon (National Academy of Sciences, 1983) zu schwefeliger Säure. Aufgrund ihres notwendigen und effektiven Gasaustauschsystems haben Pflanzen eine große Oberfläche, die zur Aufnahme von  $\text{SO}_2$  aus der Luft durch die geöffneten Stomata der Blätter führt. Innerhalb der Blätter führt die Hydratation von  $\text{SO}_2$  zu schwefeliger Säure, die mit  $\text{pK}$ -Werten von 1,8 und 7,2 durch Freigabe von Protonen zu Bisulfit und Sulfitanionen dissoziiert. Als nucleophiles Agens kann Sulfit verschiedenste zelluläre Substanzen angreifen und hohen Schaden anrichten (Petering, 1977; Heath, 1980). Für verschiedenste Enzyme, die in den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen involviert sein können, wurde eine Inhibition nachgewiesen, wenn Pflanzen unter hohen Konzentrationen an Sulfit kultiviert wurden (Tanaka *et al.*, 1982). Eine solche Inhibition konnte auch für das Enzym Katalase gezeigt werden. Als Leitenzym der Peroxisomen setzt sie das Zellgift  $\text{H}_2\text{O}_2$  um und übernimmt so eine photooxidative Schutzfunktion. Aufgrund einer stetigen Inaktivierung der Katalase liegt sie in hohen Konzentrationen vor und muß durch Neusynthese nachgeliefert werden. Hierbei wird die Translation an freien Polysomen durch die Anwesenheit von Häm-Gruppen aktiviert und das im Cytoplasma synthetisierte Holoprotein gelangt in gefalteter Form in die Peroxisomen, den Ort seiner Wirkung. Durch die starke Toxizität des reaktiven  $\text{SO}_2$ -Anions muß der pflanzliche Organismus in der Lage sein, die Konzentration kontrollieren zu können.

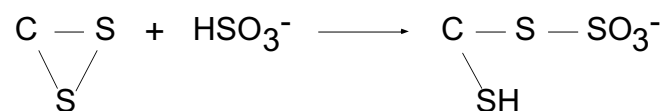


Versuche mit isolierten Thylakoidmembranen aus Blättern zeigten, daß diese eine Oxidation von Sulfit zu Sulfat ermöglichen. Die nicht-enzymatische Reaktion ist lichtabhängig und sensitiv gegen den Elektronentransport-Inhibitor DCMU. Für Cyanid konnte eine Insensitivität festgestellt werden (Asada & Kiso, 1973, Asada, 1980). Initiiert wird die lichtabhängige Radikal-Kettenreaktion durch Sauerstoff-Radikale, die durch die univalente Reduktion innerhalb der Mehler-Reaktion entstehen (Mehler, 1951). Die Reaktion kann folgendermaßen zusammengefaßt werden:



Während der Reaktion entstehen reaktive Hydroxyl-Radikale. Unter hohen Konzentrationen an Sulfit konnte diese Sequenz an Reaktionen auch *in vivo* nachgewiesen werden (Madamanchi & Alscher, 1991; Okpodu *et al.*, 1996). Sie ist an den Elektronentransport der Photosynthese gekoppelt und so nicht-enzymatischen Ursprungs.

Innerhalb eines Prozesses, der als Sulfitolyse benannt wurde, bindet Sulfit an oxidierte Disulfit-Komponenten, wie sie an Proteinen in offenen S-S-Brücken-Bindungen vorliegen (Pechere *et al.*, 1958; Alscher, 1984):



Oxidiertes Thioredoxin reagiert mit Sulfit und die reversible Sulfitolyse führt zur Inaktivierung (Häberlein & Follmann, 1991). Viele Enzyme der Photosynthese werden durch Thioredoxin licht-reguliert und besitzen selbst oxidierbare SH-Gruppen. Eine Sulfit-Inhibition konnte für die Alkalische Fruktose-Biphosphatase, die Phosphoribulokinase (Tanaka *et al.*, 1982), die Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (Ziegler *et al.*, 1976) und die NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase (Ziegler, 1974) gezeigt werden. So könnte die Sulfitolyse in der reversiblen SO<sub>2</sub>-abhängigen Inhibition der Photosynthese involviert sein. Thioredoxin übernimmt dabei in diesem System die Rolle eines Vermittlers.

Diese Reaktionen verschiedenster Umsetzungen an zellulären Sulfiten erklären den hohen Hintergrund von etwa 40% bei den Messungen der Enzym-katalysierten Sulfitoxidation.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Existenz eines Enzyms, welches die Oxidation von Sulfit zu Sulfat katalysiert, nachgewiesen werden. Es konnten zum ersten Mal molekulare und biochemische Analysen durchgeführt werden, die diesen neuen „Mitspieler“ im S-Stoffwechsel näher charakterisierten. Die Datenbankanalyse auf putative Zielsteuerungssequenzen, die immunologischen Nachweise des Enzyms in verschiedenen Zellfraktionen und abschließend die Immunogold-Elektronenmikroskopie zeigte eindeutig, daß die pflanzliche SOX in Peroxisomen lokalisiert ist. Die scheinbar notwendige Kompartimentierung der Sulfitoxidation in Peroxisomen läßt erste Vermutungen zur Funktion der SOX zu. Sie könnte an der Detoxifikation von Sulfit in der Zelle involviert sein und so die enzymatisch-kontrollierte Einstellung der zellulären Sulfitkonzentration übernehmen. In Peroxisomen könnte ihr eine besondere Bedeutung in einer Schutzfunktion der Katalase zuteil werden. Diese Annahme stützt sich auf die nachgewiesene Inhibition der Katalase durch Sulfit und die gemeinsame Lokalisation mit der SOX. Die wichtige Funktion der Katalase innerhalb der Photooxidation suggeriert weiterhin die Notwendigkeit eines Schutzmechanismus, kann jedoch nicht als Beweis seiner Existenz dienen. Die Beobachtung, daß die native Reinigung aus ausgewachsenen Blättern höhere Mengen an SOX erbringt, kann ein weiteres Indiz für diese Funktion sein, da in photosynthetisch-aktiven Blättern auch der Anteil der Katalase erhöht sein muß, damit sie ihrer photooxidativen Schutzfunktion nachkommen kann.

Neben dem differierenden Wirkungsort, zeigten desweiteren sowohl molekulare als auch spektroskopische und enzymkinetische Analysen deutliche Unterschiede zwischen der tierischen und pflanzlichen SOX. Das Fehlen der Häm-Gruppe in der pflanzlichen SOX verlangt entweder eine Interaktion mit einem akzessorischen Protein, welches die Funktion eines Elektronenakzeptors übernimmt, oder aber eine völlig andere Enzymkinetik. Durch die Methoden zur Identifikation eines interagierenden Proteins konnte bis jetzt kein eindeutiger

Kandidat isoliert werden. Erste Hinweise sind allerdings erbracht und können zur Klärung der Wirkungsweise herangezogen werden. So ist das putative Anionen-Kanal-Protein ein möglicher Transporter von Sulfat, welches durch die Reaktion der SOX entsteht. Es wird so aus dem Lumen der Peroxisomen transferiert und kann dem Metabolismus zugeführt werden oder in Vakuolen abgelagert werden. Bekanntermaßen kann es für den pflanzlichen Organismus ein großes Problem werden Sulfat abzuspeichern, da die Metabolisierung in schwefelhaltige Aminosäuren fast ausschließlich auf die Phase der Blattentwicklung beschränkt ist (Grill *et al.*, 1982; Soldatini *et al.*, 1992; Rennenberg *et al.*, 1996). Ein interagierendes Häm-Protein konnte allerdings nicht eindeutig identifiziert werden. Dies kann bei der gewählten Methode des Two-Hybrid-Systems an den Problemen der möglichen Isolation von Membranproteinen liegen (Kap. 3.6). Vielmehr lassen die durchgeführten Untersuchungen die Vermutung zu, daß eventuell O<sub>2</sub> der physiologische Elektronenakzeptor der pflanzlichen SOX sein könnte. Dies würde eine Kompartimentierung der Enzymreaktion in Peroxisomen klar favorisieren, da dort die Konzentration an O<sub>2</sub> im Vergleich zu anderen Kompartimenten deutlich erhöht ist.

Abschließend ist zu bemerken, daß die hier angedachten und durch erste biochemische Analysen nachgewiesenen Indizien für eine Funktion der pflanzlichen SOX innerhalb der Forschergruppe „Molekulare Grundlagen der Sulfat-Assimilation bei Pappeln: Die Bedeutung der Sulfitoxidase“ in den nächsten Jahren weiter untersucht werden und Teilergebnisse dieser Arbeit sicherlich zur Klärung der Physiologie herangezogen werden können. Durch die Optimierung der Überexpression der rAt-SOX kann auf Mengen an Protein zurückgegriffen werden, die in näherer Zukunft eine Kristallisation des Proteins ermöglichen. Die Strukturaufklärung und der Vergleich mit den generierten punktmutierten At-SOXs bzw. der Moco-Domäne der Nitratreduktase sollte zur Aufklärung der Natur des aktiven Zentrums mit dem Molybdän führen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Verwendete Chemikalien, Enzyme und eingesetzte Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Sigma (Deisenhofer), Fluka (Schweiz), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden geliefert von Perkin Elmer, Stratagene, Boehringer, Promega und Clontech. Die verwendeten Radiochemikalien wurden bezogen von den Firmen AP Biotech und ICN. Die eingesetzten Chromatographie-Matrices stammen von den Firmen AP Biotech, BioRad und Qiagen.

Zur Grundausstattung des Botanischen Institutes der TU Braunschweig gehören folgende benutzte Geräte:

FPLC-Anlage (P-500, LCC-501 Plus, UV1, Conductivity Monitor, Frac-100)	AP Biotech (Freiburg)
Niederdruck-Chromatografieanlage (GradiFrac, UV1, P1-Pumpe)	AP Biotech (Freiburg)
Sequencer AbiPrism 310	Perkin Elmer
Proteintransferapparatur	Biometra
Spektralphotometer UV-Spec300	AP Biotech (Freiburg)
Kühlzentrifuge 2K 15	Sigma (Deisenhofen)
Kühlzentrifuge Suprafuge 22	Beckmann
Proteingelelektrophorese-Systeme	Hoefer/AP Biotech (Freiburg)
Ultraschallgerät Sonifer 250	Branson (Danbury, USA)
HPLC-System Serie 1100	Hewlett Packard (USA)
IPGphor	AP Biotech (Freiburg)
French Press	Amicon (USA)

### 4.1.2 Verwendete Organismen-Stämme

Bezeichnung	Referenz	Genotyp/Charakteristika	Anzucht
<i>E. coli</i>			
DH5α	Hanahan, (1983)	<i>supE</i> 44Δ <i>lac</i> U169 (Δ80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsd</i> R17 <i>recA</i> <i>endA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> -1 <i>relA</i> 1	LB, 37°C
M15(pREP4)	Villarejo&Zabin, (1974)	<i>Nal<sup>S</sup></i> , <i>Str<sup>S</sup></i> , <i>rif<sup>S</sup></i> , <i>lac<sup>-</sup></i> , <i>ara<sup>-</sup></i> , <i>gal<sup>-</sup></i> , <i>mtl<sup>-</sup></i> , <i>F<sup>-</sup></i> , <i>recA<sup>+</sup></i> , <i>uvr<sup>+</sup></i>	LB, 37°C
TOP10F <sup>+</sup>	Invitrogen	F <sup>+</sup> { <i>proAB</i> , <i>lacZ</i> ΔM15,Tn10(Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> ,Δ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i> ), Φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX</i> 74, <i>deoR</i> , <i>recA</i> 1, <i>araD</i> 139, Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> ), <i>endA</i> 1, <i>nupG</i> λ <sup>-</sup>	LB, 37°C
TP1000	Palmer <i>et al.</i> , 1996	F <sup>+</sup> Δ <i>lacU</i> 169 <i>araD</i> 139 <i>rpsL</i> 150 <i>relA</i> 1 <i>ptsF</i> <i>rbsR</i> <i>flbB</i> Δ( <i>mobAB</i> )	LB, 37°C
MC4100	M.C. Casadaban	F <sup>+</sup> Δ <i>lacU</i> 169 <i>araD</i> 139 <i>rpsL</i> 150 <i>relA</i> 1 <i>ptsF</i> <i>rbsR</i> <i>flbB</i>	LB, 37°C
MJ7chlN	Johnson&Rajagopalan, (1987)	Δ <i>lacU</i> 169 <i>araD</i> 139 <i>rpsL</i> <i>gyrA</i> <i>nonchlN</i> 134	LB, 37°C
JM 101	Messing <i>et al.</i> , 1981	Δ( <i>lac-pro</i> ) <i>thi</i> <i>supE</i> F <sup>+</sup> <i>tra</i> D36 <i>pro</i> <i>AB<sup>+</sup></i> <i>lacI<sup>f</sup></i> ZΔM15	LB, 37°C
<i>S. cerevisiae</i>			
SFY526	Bartel <i>et al.</i> , 1993	<i>MATa</i> , <i>ura3</i> -52, <i>his3</i> -200, <i>lys2</i> -801, <i>ade2</i> -101, <i>trp1</i> - 901, <i>leu2</i> -3,112, <i>can<sup>r</sup></i> , <i>gal4</i> -542, <i>gal80</i> -538, <i>URA3::</i> <i>GAL1-lacZ</i>	SD, 30°C
AH109	James <i>et al.</i> , (1996)	<i>MATa</i> , <i>ura3</i> -52, <i>his3</i> -200, <i>ade2</i> -101, <i>trp1</i> -901, <i>leu2</i> -3, 112, <i>gal4</i> Δ, <i>gal80</i> Δ, <i>LYS2::GAL1<sub>uas</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-</i> <i>MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	SD, 30°C
HF7c	Feilotter <i>et al.</i> , (1994)	<i>MATa</i> , <i>ura3</i> -52, <i>his3</i> -200, <i>lys2</i> -801, <i>ade2</i> -101, <i>trp1</i> - 901, <i>leu2</i> -3,112, <i>gal4</i> -542, <i>gal80</i> -538, <i>LYS2::GAL1-</i> <i>HIS3URA3::GAL4</i> -17mers) <sub>3</sub> - <i>CYC1-lacZ</i>	SD, 30°C

### 4.1.3 Anzuchtbedingungen der Pflanzen

In dieser Arbeit wurden *Nicotiana plumbaginifolia* *in vitro* Pflanzen, Kallus- und Suspensionskulturen, *Nicotiana tabacum* Pflanzen und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen aus Erdkultur bzw. *in vitro* Kulturen verwendet.

Kallus- und Suspensionskulturen von *N. plumbaginifolia* wurden auf NH<sub>4</sub>-SU-Festmedium (0,9% (w/v) Agar) (Grafe & Müller, 1983) mit 20 mM KCl und 40 mM NH<sub>4</sub>-Succinat 2–4 Wochen vereinzelt und anschließend auf entsprechendes Flüssigmedium überführt. Wöchentlich wurden die Suspensionskulturen um  $\frac{1}{3}$  verdünnt und mit frischem Medium gewaschen. Die Kalluskulturen wurden alle 14 Tage subkloniert.

Pflanzen von *A. thaliana* wurden *in vitro* auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) unter Zusatz von je 10 mM KNO<sub>3</sub> und NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> bei 20°C unter Kurztag-Bedingungen (10 h Licht, 14 h Dunkel) für 3-4 Wochen kultiviert. Erdkulturen von *A. thaliana* und *N. tabacum* wurden in nährstoffarmer Aussaaterde (Frux, Hameln) angezogen und zweimal wöchentlich gegossen (1x mit Flüssigdünger – „Compo“ Hakaphos-Nährsalz).

#### 4.1.4 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Quelle	Verwendungszweck
pBlueskript II SK+	Short <i>et al.</i> , 1988	Subklonierung, Sequenzierung
pGEM-Teasy	Promega (Madison, USA)	Subklonierung, Sequenzierung
pQE30	QIAgen/Bujard <i>et al.</i> , 1987	Überexpression in <i>E. coli</i>
pQE60	QIAgen/Bujard <i>et al.</i> , 1987	Überexpression in <i>E. coli</i>
pQE80	QIAgen, 2000	Überexpression in <i>E. coli</i>
pREP4	QIAgen/Farabaugh, 1978	Überexpression in <i>E. coli</i>
pGBKT7	Clontech, 1993	Two-Hybrid-System
pGAD10	Clontech, 1993	Two-Hybrid-System

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide und Subklone basieren auf der Verwendung der aufgeführten Plasmide. Die jeweiligen Klonierungen sind in den entsprechenden Kapiteln näher erläutert.

#### 4.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco/BRL hergestellt.

Primer- Bezeichnung	Sequenz mit Restriktionsstellen in 5' – 3' Richtung	Verwendung
At-sox5'-NcoI	CCT CGA AAG AAC <u>CAT GGC</u> TGG AAT TAG AGG TCC T <i>NcoI</i>	Klonierung der At-sox in pQE60
At-sox 3'-BglII	GGT AAC TTA <u>GAT CTC</u> AAG TTA GAG TGG CCA AGC CG <i>BglII</i>	Klonierung der At-sox in pQE60
QIAex-prom	GGC GTA TCA CGA GGC CCT TTC G	Sequenzierung der pQE-Vektoren
QIAex-rev	GGA CAA CTA TCT AGG TCA TTA C	Sequenzierung der pQE-Vektoren
At-sox R51Q	CCT TTT CTA CAA GCA AAA TCA TGG	Punktmutation der rAt-sox in pQE80
At-sox R51Q rev	CCATGA TTT TGC TTG TAG AAA AGG	Punktmutation der rAt-sox in pQE80
At-sox C98A	GCT ACT CTT CAG GCT GCC GG	Punktmutation der rAt-sox in pQE80
At-sox C98A rev	CCG GCA GCC TGA AGA GTA GC	Punktmutation der rAt-sox in pQE80
At-sox E192M	CGC TTA TAT GAT GAA TGG	Punktmutation der rAt-sox in pQE80
At-sox E192M rev	CCA TTC ATC ATA TAA GCG	Punktmutation der rAt-sox in pQE80
5'- heme sox rattus	CGG GGA TGG AAA <u>GCC ATG GGG</u> ACC CTG ATA GGC <i>NcoI</i>	Klonierung der Mm-sox in pQE60
3'- heme sox rattus	GGG GGC <u>CAT GGT</u> ATC TTC GGG GTT CAG TTC CCC <i>BamHI</i>	Klonierung der Häm-Domäne der Mm-sox in pQE60
3'-BamHI-At-sox	GGT AAC TTG <u>GGA TCC</u> AAG TTA GAG TGG CC <i>BamHI</i>	Klonierung der At-sox in pGBKT7

#### **4.1.6 Antikörper**

Zur Detektion Histidin-getaggtter Polypeptide standen monoklonale Antikörper der Firma Dianova (Hamburg) zur Verfügung. Diese Antikörper besitzen eine hohe spezifische Genität gegen ein Histidin-Hexapeptid und wurden bei Immunoblot-Analysen 1:1000 verdünnt eingesetzt.

Im Laufe dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper (aus Kaninchen) gegen rAt-SOX von der Firma Biosciences (Göttingen) hergestellt. Die IgG-Fractionen des erhaltenen Serums wurden für Immunoblot-Analysen 1:500 verdünnt eingesetzt.

Als sekundäre Antikörper wurden mit alkalischer Phosphatase-gekoppelte Antikörper gegen Kaninchen oder Maus IgG (Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen) in Verdünnungen von 1:1000 – 1:7500 verwendet.

### **4.2 Methoden**

#### **4.2.1 Molekularbiologische Arbeiten**

##### **4.2.1.1 Klonierung**

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA standen die *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  und JM101 zur Verfügung. Glycerol-Stammkulturen wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde die Minipräparationsmethode von Del Sal *et al.* (1989) gewählt. Alle weiteren verwendeten Klonierungsmethoden wurden in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.



#### **4.2.1.2 DNA-Isolation**

Zur Klonierung notwendige DNA wurde mittels NucleoSpin® Extract der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Vorschrift des Herstellers aus Agarosegelen isoliert und gereinigt oder nach der PCR-Amplifikation von den enthaltenen Proteinen getrennt.

#### **4.2.1.3 PCR-Amplifikation**

Die PCR-Amplifikationen wurden in Anlehnung an Sambrook *et al.* (1989) mit 50-100 ng DNA-Template und jeweils 50 pmol Primer im 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Hybridisierungstemperatur, Synthese- und Denaturierungsdauer wurden nach den auftretenden Fehlpaarungen der Primer und ihrer Länge sowie der Amplifikatgröße von Fall zu Fall variiert.

#### **4.2.1.4 DNA-Sequenzierung**

Bei der Sequenzierung erfolgt zuerst die PCR-Synthese eines über Didesoxynukleotide terminierten fluoreszenz-markierten Komplementärstranges. Die als DNA-Template eingesetzte Plasmid-DNA wurde durch den QIAwell8 Plasmid-Kit (QIAGEN) bzw. mit dem NucleoSpin-Plasmid-Kit der Firma Macherey & Nagel gereinigt. Die Sequenzierreaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Das gefällte DNA-Pellet wurde nach der Resuspendierung und Denaturierung auf einer Kapillare (310 Kapillare, 47 cm x 50 µm für POP 6 Polymer und für kurze Sequenzierläufe) im ABI Cycle Sequencer 310 aufgetrennt.

## **4.2.2 Proteinbiochemische Standardmethoden**

### **4.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteinproben wurden durch das diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsystem, bestehend aus Sammel- und Trenngel, nach Laemmli (1970) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Der Acrylamidgehalt der Sammelgele betrug 4% (w/v), der der Trenngele variierte zwischen 7,5 und 12,5%. Die Denaturierung der Proteine in den zu analysierenden Proben erfolgte durch einen 5 x SDS-Ladepuffer (50% (v/v) Glycerol, 3,5% (w/v) SDS, 2 M  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,02% (w/v) Bromphenolblau) für 7 min bei 95°C. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im kleinen Gelsystem (Hoefer) für 1-1,5 h bei 250 V unter Wasserkühlung, im großen Gelsystem für 4 h bei 450 V / 75 mA (pro Gel) bzw. 12 – 18 h bei 80 V.

### **4.2.2.2 Proteinfärbung**

Die PAGE-Gele werden direkt nach der Elektrophorese (Kap. 4.2.2.1.) in die Färbelösung (10% (v/v) Eisessig, 25% (v/v) unvergälltes Ethanol, 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250) überführt. Die Fixierung und Färbung der elektrophoretisch getrennten Proteine erfolgt bei dieser Färbemethode gleichzeitig. Die Färbedauer für ein 1 mm dickes Gel beträgt etwa 30 bis 45 Minuten. Nachdem die Färbelösung abgegossen wurde, wird unter mehrfachem Wechsel durch die Entfärbelösung (10% (v/v) Eisessig, 25% (v/v) unvergälltes Ethanol) entfärbt. Eine Temperaturerhöhung auf 40 bis 50°C beschleunigt Färbung und Entfärbung.

Alternativ werden geringere Proteinmengen über eine Variante der Silberfärbung von Heukeshoven und Dernick, 1988 visualisiert. Zur Fixierung der Proteine wird das Gel für etwa 1h in Fixierlösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Ethanol) geschwenkt und nach

gründlichem Waschen mit Wasser dann für mindestens 1h in Inkubationslösung (500 mM NaAc, 0,2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ , 25% (v/v) Ethanol, 0,5% (v/v) 25%iges Glutaraldehyd) belassen. Anschließend ist für dreimal 15 min mit dest. Wasser zu waschen und 20 min in Färbelösung (0,2% (w/v)  $\text{AgNO}_3$  in dest. Wasser, 2  $\mu\text{l}$  37% Formaldehyd je 10 ml kurz vor Gebrauch zugeben) leicht zu schwenken. Die Entwicklung erfolgt durch eine 2,5%ige (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, pH 11-11,5, der kurz vor Gebrauch 1  $\mu\text{l}$  37%iges Formaldehyd je 10 ml zugegeben wurde. Die Färbereaktion kann durch Abgießen der Entwicklerlösung und Zugabe der Stopplösung (20 mM EDTA in dest. Wasser) abgebrochen werden.

#### **4.2.2.3 Immunoblot Analyse**

Für eine spezifische Detektion gereinigter oder sich in Rohextrakten befindender Proteine wurde die Immunoblot-Analyse angewand. Dabei transferiert man die Proteine nach erfolgter Größentrennung in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (Kap. 4.2.2.1.) auf eine Trägermembran (PVDF-Membran ImmobilonP, Amersham), auf der die immobilisierten Proteine dann mittels Antikörper detektiert werden können. Der Proteintransfer wurde in einer Biometra-Blotapparatur im kontinuierlichen Puffersystem durchgeführt und konnte anschließend mittels einer reversiblen Färbung mit 5% (v/v) Ponceau S visualisiert werden.

Der immunologische Nachweis spezifischer Proteine wurde nach einer einstündigen Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an der Membran durch eine 3% (w/v) BSA (Rinderserumalbumin) in TBS mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT bzw. ÜN bei 4°C initiiert.

Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für 10 min mit TBSTXS entfernt und die Membran erneut blockiert. Nach der Inkubation der Membran mit gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse) markiert mit alkalischer Phosphatase konnten durch den enzymatischen Umsatz des

Substrates NBT (Nitro-Blau-Tetrazolium) und BCIP (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin) die Proteine detektiert werden.

#### **4.2.2.4 Dialyse**

Zur Dialyse von Proteinlösungen wurden Dialyse-Membranen mit einem Ausschlußvolumen von 10 kDa verwendet. Die Membranschläuche wurden vor ihrer Benutzung nach Sambrook *et al.* (1989) behandelt. Die Dialyse wurde in einem mindestens 100x höheren Pufferreservoir im Vergleich zum Probenvolumen für 12 h durchgeführt, wobei der Puffer innerhalb dieser Zeit dreimal gewechselt wurde. Zur Vermeidung von Proteinagglomeraten wurde die Proteinlösung nach der Dialyse durch eine 0,25 µm Membran (Gelman Science, Supor Arodisc 25) filtriert, um so entstandene Aggregate zu entfernen.

#### **4.2.2.5 Gelfiltration**

Zur Umpufferung bzw. Entsalzung geringer Proteinlösungsvolumina wurden entweder vorgepackte Sephadex G-50 (Nick-Säulen (Pharmacia)) oder vorgepackte Sephadex G-25 (PD-10 Säulen (Pharmacia)) benutzt. Die mit 5 Säulenvolumen Puffer äquilibrierte Säule wurde mit der Proteinlösung beladen ( 400 µl für Sephadex G-50 (Nick-Säulen), 2,5 ml für Sephadex G-25 (PD-10 Säulen)) und anschließend die umgepufferte Proteinfraction mit 5/4 Volumen des Probenvolumens eluiert. Es lagen nach der so durchgeführten Gelfiltration 80% der eingesetzten Proteinmenge in 95% des neuen Puffers vor.

Zur Bestimmung der Größe von Polypeptiden bzw. für die Molekulargrößenseparierung von Proteinextrakten kam eine vorgepackte Gelfiltrations-Säule Superdex 200 (Trennbereich zwischen 10 – 600 kDa) der Firma Pharmacia zum Einsatz. Um eine ausreichende Trennung der Proteine zu gewährleisten, wurde ein maximales Probenvolumen von 200 µl bei einer

Flußgeschwindigkeit von 0,3 ml/min an der FPLC (Pharmacia) chromatografiert. Durch Kalibrierung der Säule mit einem BioRad-Protein-Standard-Mix konnten die Molekulargewichte über die ermittelten Elutionsvolumina berechnet werden.

#### **4.2.2.6 Proteinkonzentration**

Die Konzentrierung von Proteinlösungen wurde durch Ultrafiltration an semipermeablen Membranen durchgeführt. Für Volumina ab 5 ml wurden Druckfiltrationszellen (Prepcell 8010/8050, Amicon) verwendet, bei denen durch Anlegen eines Druckes die Proteinlösung durch die Membran filtriert wurde. Die Membranen (YM3 bzw. YM10, Amicon) hatten eine Ausschlußgröße von 3 bzw. 10 kDa. Für Probenvolumen unter 5 ml kamen Zentrifuge-Konzentratoren (Centricon 3/10, Amicon) zur Anwendung.

#### **4.2.2.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinrohextrakten wurde unter Verwendung von Rinderserum-Albumin (BSA) als Standard-Protein das Bradford-Proteinreagenz (BioRad) nach der Methode von Bradford (1976) benutzt. Bei der Bestimmung wurde sich an die Vorschrift des Herstellers gehalten.

Die Proteinkonzentration homogener Lösungen gereinigter Proteine konnte durch den berechneten kalkulativen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (Gill & Hippel, 1990) ermittelt werden. Hierzu wurde die Homogenität der Proteinlösung zunächst durch eine Aufnahme des UV-Spektrums zwischen 200 – 320 nm kontrolliert. Eine zweite Messung der Probe mit 0,1% (w/v) SDS schloß eine faltungsbedingte Abschirmung der absorbierenden Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin aus.

#### **4.2.2.8 Proteinsequenzierung**

Sowohl die exprimierten Proteine als auch die nativ gereinigte SOX aus *N. tabacum* wurden durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz überprüft. Nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (Kap.4.2.2.1.) und dem Transfer auf PVDF-Membran (Kap. 4.2.2.3.) wurden die zu analysierenden Proteine mittels Ponceau S gefärbt und die Proteinbande in einer möglichst kleinen Fläche ausgeschnitten. Diese Probe wurde zur Sequenzierung in einem Proteinsequencer 477A (Applied Biosystems) an der GBF Braunschweig (Abteilung MISF) eingesetzt.

#### **4.2.2.9 Färbung von Häm-Domänen im SDS-Polyacrylamidgel**

Proteine mit Hämdomänen können mit dem Substrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMBZ) in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen (Kap. 4.2.2.1.) gefärbt werden. Dabei macht man sich die Peroxidase-Aktivität des Cytochroms zu Nutze, welche das Substrat sehr sensitiv in einen blauen stabilen Farbstoff umsetzt. Eine 6,3 mM TMBZ-Lösung (Aldrich Chemical Co.) wurde frisch in Methanol angesetzt. Kurz vor dem Gebrauch wurden drei Teile dieser TMBZ-Stammlösung mit sieben Teilen 25 mM Natriumacetat, pH 5,0 gemischt und das zu färbende SDS-Polyacrylamidgel für 1–2 h bei RT im Dunkeln in dieser Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 30 mM konnte die Färbung innerhalb der nächsten 3 min verfolgt werden. Die so gefärbten Gele wurden in Acetat-gepuffertem 30%-igen (v/v) Isopropanol gelagert.

### **4.2.3            Spektroskopische Arbeiten**

#### **4.2.3.1           UV/vis-Spektroskopie**

UV/vis Absorptionsspektren wurden in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen (200 – 320 nm bzw. 200 – 700 nm) an einem Spektralphotometer (Ultraspec 300, AP Biotech) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm und einer Scangeschwindigkeit von 5 nm/s aufgenommen.

#### **4.2.3.2           EPR-Spektroskopie**

Die EPR-Spektren wurden an einem Brüker ER 300 Spektrometer ausgestattet mit einem ER 035M NMR Gaussmeter und einem Hewlett Packard 5352B Mikrowellen-Frequenz-Zähler durchgeführt. Die Temperatur wurde während der Aufnahme der Spektren durch ein Brüker ER 4111 VT Kryostat (kontinuierlicher Fluß von flüssigem Stickstoff) kontrolliert.

Die zu vermessende Proteinlösung wurde über Nick-Säulen in die jeweiligen Puffer umgepuffert und anschließend sofort je 250 µl mit einem „equal“ Sulfit in einer Glaskapillaren versetzt. Nach 20 s wurden die Glaskapillaren in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so längere Zeit aufzubewahrende Probe wurde zur Vermessung mit der Glaskapillaren in das Brüker ER 300 Spektrometer eingespannt und vermessen. Die Messungen wurden bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,458 GHz und einer Leistung von 10 mW, 100 kHz Modulationsfrequenz und 5,0 G Modulationsamplitude durchgeführt.

#### **4.2.4 Messungen der SOX-Enzymaktivitäten**

##### **4.2.4.1 Bestimmung der SOX-Enzymaktivität mit Ferricyanid**

Die Steady-state-Kinetik Messungen wurden aerob bei 25°C in einer Plastikkuvette mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Endvolumen von 1ml durchgeführt. Die Experimente wurden zur Reduzierung der Salzinhibition durch Cl-Ionen in 20 mM Tris/Acetate, pH 8,0, 1 mM EDTA durchgeführt. In dem Standard-Probenansatz lagen 400 µmol Ferricyanid und 400 µmol Sulfit vor. Die Konzentration der Ferricyanidlösung konnte durch die Bestimmung der OD bei 420 nm mit dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von  $1020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  berechnet werden. Durch die Zugabe der Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet und über 1 min die Abnahme der OD bei 420 nm verfolgt. Durch die Berechnung des umgesetzten Ferricyanids pro min konnte direkt die umgesetzte Menge an Sulfit pro min ermittelt werden. Mit der Proteingesamtkonzentration wurde dieser Wert auf die mg eingesetztes Protein bzw. µmol eingesetztes Enzym korreliert. Eine Einheit der SOX-Aktivität wurde definiert als die Menge an Enzym, die notwendig ist die Absorptionsdifferenz von 1,0/min bei 25°C in einem Reaktionsvolumen von 1 ml zu ermöglichen.

Zur Bestimmung der Sulfit- und Ferricyanid-Abhängigkeit der Enzymreaktion wurde die Konzentration beider Substanzen im Testansatz variiert.

Bei den Messungen der Salzinhibitionen wurden die ausgewählten Salze in unterschiedlichen Endkonzentrationen für das Endvolumen berechnet und die Anfangssteigungen der OD bei 420 nm miteinander verglichen.



#### **4.2.4.2 Bestimmung der SOX-Enzymaktivität mit Cytochrom c**

Die Cytochrom c-Reduktase Aktivität der tierischen SOX wurde mit einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{mol}$  Cytochrom c und einer Natriumsulfit-Konzentration von 400  $\mu\text{mol}$  in einem Gesamtvolumen von 1 ml durch Messung der Absorptionssteigung bei 550 nm über 1 min verfolgt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Cytochrom c-Umsatz (Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von 19630  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 550 nm) mit der eingesetzten Enzymmenge korreliert.

#### **4.2.4.3 Bestimmung der SOX-Enzymaktivität mit Ferricenium-hexafluorophosphat**

Als alternativer Elektronenakzeptor diente Ferricenium-hexafluorophosphat (Aldrich Chemicals). Eine 100 mM Stammlösung des Ferricenium-hexafluoro-phosphat-Salzes wurde frisch in 10 mM HCl angesetzt und der sich durch Reduktion bildende Niederschlag mit einem 0,22  $\mu\text{m}$  Vorfilter entfernt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von 410  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 617 nm verwendet. Mit einer Endkonzentration von 50–100  $\mu\text{mol}$  Ferricenium-hexafluorophosphat wurde nach Zugabe des Enzyms und variierender Konzentrationen an Sulfit die Absorptionsabnahme bei 300 nm verfolgt.

#### **4.2.5 Überexpression und affinitätschromatographische Reinigung Histidin-markierter Proteine an Ni-NTA-Matrices**

Für die Überexpression und affinitätschromatographische Reinigung stand das Expressionssystem QIAexpress der Firma QIAGEN zur Verfügung. Bei den benutzten Vektoren handelt es sich um prokaryotische Expressionsvektoren, bei denen die Expression durch IPTG induzierbar ist. Durch die Klonierung der gewünschten DNA in den Vektor wird

das translatierte Polypeptid um eine sechs Aminosäure lange Histidin-Markierung verlängert, die die Reinigung über eine Ni-NTA-Matrix ermöglicht.

#### **4.2.5.1 Kulturbedingungen der Überexpression**

Da die Benutzung älterer Expressionskulturen zu einer drastischen Verringerung der Proteinausbeute an exprimierten Protein führten, wurde stets zunächst Plasmid-DNA frisch in einen Expressionsstamm transformiert. Die auf Selektionsmedium gewachsenen Einzelkolonien dienten als Ausgangspunkt für die Überexpression. Eine Einzelkolonie wurde der Selektionsplatte steril entnommen und über Nacht bei 37°C in LB-Flüssigmedium (5 ml) kultiviert. Am nächsten Tag wurde nach der Kontrolle der Plasmid-DNA, diese Kultur zur Animpfung einer 250 ml-Zwischenkultur benutzt. Nach Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,8\text{--}1,2$  konnte von dieser Kultur ausgehend entweder eine Expressionskinetik im kleineren Maßstab von 5 ml-Kulturen durchgeführt werden oder es wurden 8 L-2xYT-Flüssigmedium zur Anzucht einer Großkultur verwendet. Der Großkultur wurden die entsprechenden Antibiotika zur Selektion, 0,1 mM IPTG zur Induktion der Expression und 1 mM Molybdat zur Erhöhung der Moco-Saturierung beigelegt. Aufgrund des großen Volumens wurde die Kultur in Anlehnung an die Fermentationstechnik durch ein Glasrohr mit Luft für 24 h bei RT begast.

Mit einer Zentrifugation der Kultur bei 5000xg für 15 min bei 4°C wurden die Bakterienzellen geerntet und sofort lysiert (Kap. 4.2.5.2.) oder das Bakterienpellet bis zur weiteren Verwendung in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei –70°C gelagert.

#### 4.2.5.2 Bakterienzellyse

Die Lysebedingungen stellen eine Kombination zwischen enzymatischem- und mechanischem Zellaufschluß da. Um die Proteaseaktivität während der Lyse so gering wie möglich zu halten, wurden sämtliche Arbeit bei 4°C oder auf Eis und in Anwesenheit verschiedener Protease-Inhibitoren durchgeführt.

Das Zellpellet einer 8 l-Expressionskultur wurde direkt nach der Zentrifugation bzw. nach 30 minütigem Auftauen auf Eis mit 100 ml Lysis-Puffer (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 1 mg/ml Lysozym, pH 8,0) gründlich resuspendiert. Für den enzymatischen Zellaufschluß durch Lysozym wurde die Zellsuspension für 30 min bei RT und anschließend für 30 min auf Eis geschwenkt. Die Lysozym-behandelten Zellen wurden durch dreifache Passage durch eine „French Press“-Zelle bei maximal 20.000 psi mechanisch lysiert und dann zur Verringerung der Viskosität durch freiwerdende genomische DNA für 5 min auf Eis mit Ultraschall (Branson Sonifer 250 (USA), Stufe 4, 80%) behandelt. Der klare Überstand nach einer Zentrifugation bei 21.000xg (20 min bei 4°C) wurde durch einen 0,25 µm-Spritzenvorfilter filtriert und das unlösliche Pellet erneut in  $\frac{1}{3}$  Volumen Lysis-Puffer des ursprünglich eingesetzten Volumens solubilisiert. Nach einer weiteren Ultraschall-Behandlung konnte der klare Überstand einer folgenden Zentrifugation bei 21.000xg (20 min bei 4°C) weiterverwendet werden.

#### 4.2.5.3 Affinitätschromatographische Reinigung an Ni-NTA-Matrix

Zur Verringerung der Protease-Aktivität wurden alle chromatographischen Reinigungsschritte bei 4°C an einer Niederdruck-Chromatographie-Anlage mit Peristaltikpumpe (GradiFrac, AP Biotech) mit filtrierten und entgasten Puffern durchgeführt. Dabei konnte durch Messung der Absorption bei 280 nm durch einen nachgeschalteten UV-Detektor (UV1, AP Biotech) die Proteinkonzentration im Säuleneluat verfolgt werden. Zunächst wurden die vorfiltrierten klaren Proteinlösungen nach der Lyse auf eine mit Lysis-Puffer äquilibrierte Ni-NTA-superflow-Säule (20 ml Matrixvolumen) bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min geladen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min bis zu einer OD<sub>280</sub> von 0,001 mit Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit einem 20-fachen Volumen Wasch-Puffer ( 50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM Imidazol, pH 6,0) ließ weitere unspezifisch bindende Proteine von der Säule eluieren. Gebundene Proteine wurden mit 10 Säulenvolumen eines linearen Imidazolgradienten von 20–500 mM Imidazol (pH 7,0) in Wasch-Puffer bei einer verringerten Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min in 10 ml-Fractionen eluiert. 20 µl der Protein-enthaltenen Fractionen wurden im SDS-PAGE (Kap. 4.2.2.1.) aufgetrennt und mittels Coomassie-Blau-Färbung (Kap. 4.2.2.2.) visualisiert.

Proteinfraktionen mit reinem Protein wurden vereinigt und gegen das 50 – 100 fache Volumen eines Dialyse-Puffers ( 50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,5) durch mehrmaliges Pufferwechseln dialysiert (Kap. 4.2.2.4.). Die vollständig dialysierte Proteinlösung wurde auf etwa 5 mg/ml ankonzentriert (Kap. 4.2.2.6.) und nach Sterilfiltration bei –70°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

## **4.2.6 Reinigung der pflanzlichen Sulfitoxidase aus *Nicotiana tabacum* (Nt-SOX)**

### **4.2.6.1 Extraktion des Enzyms aus pflanzlichem Gewebe**

Als pflanzliches Ausgangsmaterial für die native Reinigung der Sulfitoxidase wurde grünes Blattmaterial von *Nicotiana tabacum* verwendet. Nach Entfernen der Mittelrippe der Blätter wurden diese sofort unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Das pulvrige pflanzliche Gewebe wurde in 3 ml / Gramm Blattfrischgewicht Extraktionspuffer (100 mM HEPES, 10% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA und 1% (w/v) PVPP, pH 7,3) bei 4°C für 30 min unter Rühren solubilisiert. Nach einer Zentrifugation (20 min, 21.000 xg, 4°C) wurde der klare Überstand nochmals durch einen 0,25 µm Vorsatzfilter filtriert.

### **4.2.6.2 Anionenaustausch-Chromatographie**

Das extrahierte Zellysate wurde im ersten Reinigungsschritt mittels Anionenaustausch-Chromatographie an SourceQ30-Matrix (AP Biotech) gereinigt. Die Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A (100 mM HEPES, 5% (v/v) Glycerol, 1 mM EDTA, pH 7,3) äquilibrierte SourceQ30-Säule (20 ml Matrixvolumen) bei einer Flußgeschwindigkeit von 3 ml/min geladen und der Säulendurchfluß zur späteren Analyse fraktioniert aufgefangen. Die Elution nicht oder schwach gebundener Proteine erfolgte mit Puffer A bis zu einer OD<sub>280</sub> von 0,001. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen linearen Salzgradienten innerhalb von 10 Säulenvolumen von 0–1 M NaCl in Puffer A. Das in 10 ml-Fraktionen aliquotierte Eluat wurde durch SDS-PAGE (Kap. 4.2.2.1) und anschließend immunologischen Nachweis (Kap. 4.2.2.3) analysiert und Fraktionen mit SOX durch eine Amicon-Konzentrationszelle ankonzentriert (Kap. 4.2.2.6).

#### **4.2.6.3 Gelfiltration**

Im folgenden Reinigungsschritt wurde die hochkonzentrierte Proteinlösung mittels vorgepackter Superdex 200-Säule (AP Biotech) nach der Molekulargewichtsgröße getrennt. Die verwendete Säule wies eine optimale Trennung im Größenbereich von 10 – 600 kDa auf. Standardmäßig wurde die Säule in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibriert. Die Proteinlösung wurde in einem maximalen Volumen von 200 µl über ein Injektionsloop mit einer konstanten Flußgeschwindigkeit von 0,3 ml/min aufgetragen und die Elution der getrennten Proteine über einen UV-Detektor bei 280 nm verfolgt. Im Elutionsvolumenbereich von 8–22 ml wurden 500 µl-Fraktionen aliquotiert und diese anschließend mittels SDS-PAGE (Kap. 4.2.2.1) und immunologischen Nachweis (Kap. 4.2.2.3) analysiert.

#### **4.2.6.4 Anionenaustausch-Chromatographie**

Zur weiteren Reinigung und genaueren biochemischen Analyse des gereinigten Proteins kam in einem 3. Reinigungsschritt eine vorgepackte Anionenaustauscher-Säule (Bioscale Q1 (1ml Matrixvolumen), BioRad) zum Einsatz. Die nach der Gelfiltration Nt-SOX enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und ankonzentriert (Kap. 4.2.2.6). Das Proteinkonzentrat wurde auf die mit Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5% (v/v) Glycerol, 1mM EDTA) äquilibrierte Säule mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min geladen. Die Elution nicht oder schwach gebundener Proteine erfolgte mit Puffer A bis zu einer OD<sub>280</sub> von 0,001. Das an die Matrix-gebundene Protein wurde durch einen linearen Salzgradienten zwischen 0 – 500 mM NaCl über 30 Säulenvolumen eluiert. Jeweils 20 µl der aufgefangenen 1 ml-Fraktionen wurden nach einer SDS-PAGE (Kap. 4.2.2.1) silbergefärbt (Kap. 4.2.2.2) bzw. nach Transfer auf PVDF-Membran immunologisch nachgewiesen (Kap. 4.2.2.3). Desweiteren wurden die

Proteinfraktionen auf ihren MPT-Gehalt hin untersucht, indem dieser über eine FormA-Analyse (Kap. 4.2.8.) nach Denaturierung der Proteine und Reinigung an einer QAE-Matrix an der HPLC durchgeführt werden konnte.

#### **4.2.7 Komplementation der *Neurospora crassa* Mutante *nit-1* durch MPT**

Bei der NR-defizienten *Neurospora crassa* Mutante *nit-1* (Sorger & Giles, 1965; Sorger, 1966) liegt zwar das intakte NR-Apoprotein vor, allerdings wird aufgrund einer Mutation in der MPT-Synthase-Sulfurase kein MPT bzw. Moco gebildet und es kommt zu einer Akkumulation des Precursor Z (Johnson & Rajagopalan, 1987b). Im zellfreien Extrakt kann die NR-Aktivität durch Zugabe von externem MPT/Moco komplementiert werden. Zur Quantifizierung und Detektion von exogen zugesetztem MPT oder Molybdäncofaktor wurde sich an die durchgeführten Assays (Ketchum et al., 1970; Nason et al., 1970 und Mendel et al., 1982) gehalten. Ein Assaysystem-Ansatz enthielt dabei 40µl des zellfreien *nit1*-Extraktes, 30µl *nit1*-Inkubationspuffer (0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,2-7,4; 5 mM EDTA; 1 mM DTT), 20µl der jeweilig zugesetzten Enzymrohextrakte oder aufgereinigtes Protein (gegen den Inkubationspuffer zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes dialysiert) und wahlweise 10µl 0,5 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C im Dunkeln. Zur Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität wurden jeweils 1 Volumen Lösung I (0,4 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M NaNO<sub>3</sub>, 0,2 mM FAD, pH 7,4), 1 Volumen Lösung II (0,05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) und 7 Volumen H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 350µl zum Ansatz gegeben. Durch Zugabe von 50µl 1 mM NADPH wurde die Nitratreduktase-Aktivität gestartet. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wird der Gehalt an gebildetem Nitrit durch Zugabe von je 500µl SA und NED bestimmt.

#### 4.2.7.1 Anzucht und Präparation des *nit-1* Extraktes

Als Kulturmedium für die *N. crassa nit-1* Stamm-Kultur wurde festes Fries-Medium (Mendel, 1983) verwendet. Zur Kultivierung von Konidien wurde die Kultur bei 25°C im Dunkeln angezogen (Nason & Evans, 1953) und später mit 5–10 ml ddH<sub>2</sub>O vom Festmedium heruntergespült. Es folgte eine Kultivierung in 250 ml flüssigem Fries-Medium mit 85 mM NH<sub>4</sub>Cl für 48 h bei 25°C unter Schütteln (150 rpm) im Dunkeln. Die Zellen wurden nach der Kultur filtriert, dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und zur Induktion der Nitratreduktase für 4 h in Fries-Medium mit 45 mM KNO<sub>3</sub> unter den gleichen Bedingungen weiterkultiviert. Das geerntete Myzel wurde mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das homogenisierte Pulver wurde in einem 3-fachen Volumen anaroben Extraktionspuffer (50 mM NaPi, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM Glutathion, pH 7,2) unter N<sub>2</sub>-Begasung resuspendiert. Der überständige zellfreie Extrakt einer anschließenden Zentrifugation (15 min, 12.000 xg, 4°C) wurde an einer PD-10 Säule gegen Extraktionspuffer entsalzt und bei –70°C in 400 µl-Aliquots gelagert.

#### 4.2.8 MPT- und Dinukleotid-MPT-Nachweis

MPT kann nur sehr schwer photometrisch quantifiziert werden. Die durch O<sub>2</sub>-Oxidation gebildete FormB (Johnson *et al.*, 1984) eignet sich nicht zur Quantifizierung von MPT, da sich dieses Produkt bereits unkontrolliert bei der Präparation von MPT gebildet wird. Ein geeignetes Oxidationsprodukt zur MPT-Quantifizierung liegt mit dem durch saure I<sub>2</sub>/KI-Oxidation erhaltenen FormA (Johnson *et al.*, 1984) vor. Die maximale Ausbeute an FormA ist in der Literatur mit etwa 50% angegeben, bezogen auf die eingesetzte Menge an Molybdoenzym. Beide Oxidationsprodukte FormA und FormB sind wegen ihres konjugierten heterozyklischen Ringsystems stark fluoreszierend und können so sehr sensitiv nachgewiesen



werden. Aufgrund der hohen Sensitivität gegen Luftoxidation wurde unter anaeroben Bedingungen gearbeitet.

#### **4.2.8.1            Oxidation und Dephosphorylierung von MPT bzw. MPT-Dinukleotid in einer Proteinlösung**

Basierend auf dem Protokoll von Johnson und Rajagopalan (1982) und Johnson *et al.* (1984) wurden jeweils 400 µl MPT-enthaltende Lösung bzw. Zellextrakt nach Zugabe von 50 µl Jod-Lösung ( 1% I<sub>2</sub> (w/v), 2% KI (w/v), 1 M HCl) für 30 min bei 95°C oxidiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min mit 13.000xg bei RT wurde zur Reduktion des überschüssigen Jods 56 µl einer frischen 1%igen (w/v) Ascorbinsäure zum klaren Überstand zugegeben. Durch Zugabe von 200 µl 1 M Tris (ungepuffert) wurde der pH-Wert auf 8,3 eingestellt. Zur Hydrolyse der terminalen Phosphat-Gruppe wurde dem Ansatz 6µl 1 M MgCl<sub>2</sub> und 1 U Alkalische Phosphatase zugesetzt. Der Ansatz wurde bei RT im Dunkeln für mindestens 30 min inkubiert.

Für den Nachweis des MPT-Dinukleotids wurde der Ansatz bei 25°C für 30 min oxidiert. Ansonsten wurde sich an das Protokoll für die Aufarbeitung des MPT-Dephospho gehalten.

#### **4.2.8.2            QAE-Anionenaustausch-Chromatographie**

FormA kann nach der Dephosphorylierung an einem starken Anionenaustauscher (QAE-Matrix) von phosphorylierten Pterin-Formen und anderen Kontaminationen gereinigt und entsalzt werden.

Hierzu wurde QAE-Sephadex A25 (fine, Sigma) Matrixmaterial zunächst in 1 M NaCl vorgequollen, mit filtriertem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit 1 M Ammoniumacetat in die Acetat-Form überführt. Jeweils 500 µl äquilibriertes QAE-Matrixmaterial wurde vor jeder Reinigung

mit 10 ml 1 M Ammoniumacetat und 10 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach dem Laden der Probe wurde erneut mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit 10 ml 10 mM Essigsäure eluiert. Die Elutionsvolumina mußten wegen der schwankenden Matrixmenge stets neu kalibriert werden. Die Elutionsbedingungen wurden so gewählt, daß mindestens 98% der gebundenen FormA-Dephospho innerhalb der Elutionsfraktion lagen.

Für die Detektion des MPT-Dinukleotides wurde die QAE-Säule nach der Elution durch 10 mM Essigsäure mit 10 ml 10 mM HCl gewaschen. Die Dinukleotidform des MPTs kann anschließend durch 5 ml 50 mM HCl eluiert werden. Zu dem Eluat wurden 210 µl 1 M Tris (ungepuffert) gegeben und so der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Der Ansatz wurde mit 1 µl Pyrophosphatase (1 U/µl) und 50 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> versetzt und für mindestens 1h im Dunkeln inkubiert. Nach erneuter Korrektur des pH-Wertes auf 8,5 durch ungepuffertes 1 M Tris, wurde nochmals mit 1 U Alkalische Phosphatase für mindestens 30 min im Dunkeln inkubiert. Dieser Reaktionsansatz wurde zur Entfernung von Schwebstoffen zentrifugiert (13.000xg, 5 min, RT) und an der HPLC (Kap. 4.2.8.3) vermessen.

#### **4.2.8.3 HPLC-Analyse**

Die Eluate der QAE-Reinigung wurden durch eine HPLC-Chromatographie am HPLC-System Serie 1100 der Firma Hewlett Packard an einer C18 Reverse Phase Säule gereinigt und über die Messung der Fluoreszenz der FormA-Gehalt gemessen.

## 4.2.9 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

### 4.2.9.1 Two-Hybrid-System in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde mit dem MATCHMAKER Two-hybrid System (Clontech, Palo Alto, USA) gearbeitet. Dabei handelt es sich um einen auf GAL4-basierenden transkriptionellen *in vivo* Assay. Das System beruht auf der physikalischen Trennung der beiden Domänen des eukaryotischen Transkriptions-Aktivators GAL4. Beide Domänen behalten getrennt voneinander ihre funktionellen Eigenschaften. Interaktionen von Proteinen lassen sich über die Rekonstitution des intakten Transkriptionsfaktors nachweisen. Um im Two-hybrid-System nach Interaktionspartnern für ein bekanntes Protein zu suchen, wurde die cDNA-Sequenz des bekannten Proteins (=Zielprotein) in den Hefeexpressionsvektor pGBKT7 kloniert, der für den Fusionsproteinanteil der DNA-Bindedomäne kodiert. Durch Kotransformation wurde anschließend dieser Vektor und eine im pGAD10-Vektor vorliegende representative *A. thaliana*-cDNA-Bank in den Hefestamm AH109 eingebracht. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers mit einem 30-fachen „Up-scale“-Ansatz gearbeitet. Die Transformation erfolgt durch eine PEG/LiAc-vermittelte Hitzeschock Penetration der Hefezellmembran. Der Transformationsansatz wurde anschließend pelletiert in ddH<sub>2</sub>O vollständig aufgenommen und je 400 µl auf 40 SD-Platten (-Leu, -Trp, -His) mittlerer Stringenz ausplattiert. Die 3-fache Selektion (-Leu, -Trp, -His) gewährleistet das Wachstum von Transformanten, die das Zielprotein (At-SOX) und mindestens ein Aktivator-Plasmid (pGAD10-cDNA) enthalten. Desweiteren wird durch die Wiederherstellung des Transkriptionsaktivators GAL4, der die Expression des *his3*-Reportergens und des *lacZ*-Reportergens aktiviert, auf eine Interaktion des exprimierten Fusionsproteins gescreent. Da die Suppression des *his3*-Gens nicht vollständig verlässlich erfolgt, muß die Interaktion anhand des zweiten Reportergens im Galaktosidase-Assay bestätigt werden. Hierzu wurden

nach 6-tägigem Wachstum bei 30°C die auf Selektionsmedium gewachsenen Hefekolonien auf einer „Master“-Platte vereinzelt. Von diesen „Master“-Platten ausgehend wurden die Kolonien dem Galaktosidase-Assay unterzogen. Mit Hilfe eines sterilen Samtstempels wurden die Kolonien auf SD-Festmedium hoher Stringenz (-Leu, -Trp, -His, -Ade, +X- $\alpha$ -Gal) überführt und durch eine mehrtägige Inkubation bei 30°C die Interaktion durch die direkte rotbraune Färbung der Kolonien auf dem Festmedium überprüft.

Weiterhin konnte die Aktivität des exprimierten Enzyms der  $\beta$ -Galaktosidase bei einer stattfindenden Interaktion in einem Filter-Assay nachgewiesen werden. Die das Enzym enthaltenen Kolonien färben sich durch den Umsatz des Substrates X-Gal blau. Für den Filter-Assay wurden die Kolonien auf einen Nitrocellulosefilter (Bio Trace<sup>TM</sup> NT 0,45  $\mu$ m, Gelman Sciences, Pure Nitrocellulose Transfer Membran, 82 mm dishes) übertragen, durch kurzfristiges Schockfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> aufgebrochen und der Filter für maximal 8 h bei RT auf der X-Gal-Reaktionslösung (2% (w/v) X-Gal in DMSO) inkubiert. Die Blaufärbung wurde in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von bis zu 8 h kontrolliert.

Aus den auf Interaktion getesteten positiven Hefeklonen wurde mit Säure-gewaschenen Glasperlen (Sigma) nach Vorschrift des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert und über Elektrotransformation in den *E. coli*-Amplifikationsstamm DH5 $\alpha$  transformiert. Nach Kontrolle der isolierten Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau wurde erneut eine frische ÜN-Kultur angeimpft und am nächsten Tag mit dem NucleoSpin-Plasmid-Kit der Firma Macherey & Nagel gereinigt. Die Sequenzierreaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) durchgeführt (Kap. 4.2.1.4.).

Um die Interaktion eines identifizierten *A. thal.*-cDNA-Bank-Proteins mit dem Zielprotein der At-SOX zu verifizieren, wurden das aus *E. coli* aufgereinigte cDNA-Plasmid (pGAD10-cDNA) und das Zielplasmid (pGBKT7-*At-sox*) in die Hefestämme SFY526 und HF7c kotransformiert. Mit dem Stamm SFY526 erhält man stärkere  $\beta$ -Galaktosidase-Signale in

Abhängigkeit von dem GAL1-Promotor, der die Expression des *lacZ* in SFY526 steuert. Der HF7c besitzt einen hierzu variierenden *lacZ*-Promotor. Beide Promotoren haben lediglich das GAL4-bindende Element gemeinsam, der Rest der Promotorsequenz unterscheidet sich deutlich (Bartel *et al.*, 1993b). Zur Kontrolle unspezifischer Wechselwirkungen wurde untersucht, ob das cDNA-Bank-Fusionsprotein allein transformiert und in Kotransformation mit dem leeren pGBKT7, oder dem Kontroll-Plasmid pVA3 interagiert. Von einer spezifischen Interaktion wurde nur ausgegangen, wenn sich in beiden Hefestämmen bei der Retransformation von Ziel- und Bank-Vektor eine Blaufärbung zeigte und gleichzeitig diese bei den Kontrolltransformationen ausblieb.

#### **4.2.9.3 Immuno-Affinitätschromatographie (Affi-Gel® 10, BioRad)**

Mit der Affi-Gel® 10-Matrix der Firma BioRad lassen sich Immuno-Affinitätschromatographien durchführen. Liganden mit einer primären Aminogruppe werden kovalent an das terminale Carboxyl des „Spacers“ gekoppelt. Die Kapazität der Matrix wird vom Hersteller mit 35 mg Protein/ml Matrix angegeben. Bei der Durchführung der Immuno-Affinitätschromatographie wurde sich an die Vorschrift des Herstellers gehalten. Rekombinant überexprimierte und gereinigte At-SOX (Kap. 4.2.5) wurde an die Matrix gekoppelt und anschließend mit pflanzlichem Gesamtproteinextrakt aus *A. thaliana* (Kap. 4.2.6.1) bei RT für 1 h inkubiert. Zur Analyse der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden 50 µl-Aliquots silbergefärbt (Kap. 4.2.2.2) bzw. immunologisch (Kap. 4.2.2.3) kontrolliert.

## Literatur

- Amy, N.K.** and Rajagopalan, K.V. (1979): Characterization of the molybdenum cofactor from *E. coli*. *J Bacteriol* **140**: 114-124.
- Asada, K.** (1980): Formation and scavenging of superoxide in chloroplasts, with relation to injury by sulfur dioxide. *Res Rep Natl Inst Environ Stud (Jpn)* **11**: 165-179.
- Bacher, A.** (1990): Biosynthesis of flavins. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, Vol. I, pp. 215-259. F. Müller (ed), CRC-press, Boca Raton.
- Ballantyne, D.I.** (1977): Sulphite oxidation by mitochondria from green and etiolated peas. *Phytochemistry* **16**, 49-50.
- Bethesda Research Laboratories** (1986): BRL pUC host: *E.coli* DH5<sup>α</sup> complement cells. *Bethesda Res. Lab Focus* **8 (2)**: 9.
- Bortels, H.** (1930): Molybdän als Katalysator der biologischen Stickstoffbindung. *Arch Mikrobiol* **1**: 333-342
- Boxer, D.H.**, Low, D.C., Pommier, J. and Giordano, G. (1987): Involvement of a low-molecular weight substance in *in vitro* activation of the molybdoenzyme respiratory nitrate reductase, from a chlB mutant of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed). *American Society for Microbiology*, 521-538.
- Boyington, J.C., et al.**, (1997): Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocystein and an Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-cluster. *Science* **275**: 1305-1308.
- Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bray, R.C.**, Gutteridge, S., Lamy, M.T., Wilkinson, T. (1983): *Biochem J* **211**: 227.

- Brody, M.S.**, Hille, R., (1995): *Biochim Biophys Acta* **133**: 1253.
- Brown, G.M.** (1985): Biosynthesis of pterins. In *Folates and Pterins*, Vol. 2: Chemistry and Biochemistry of Pterins, pp. 115-154, Raymond, L., Blakley, Stephen, J., Benkovics (eds), John Wiley & Sons, New York.
- Calvert, J.G.** and Stockwell, W.R. (1983): Acid generation in the troposphere by gas-phase chemistry. *Environ Sci Technol* **17**: 428A-443A.
- Coddington, A.**, (1976): Biochemical studies on the *nit*-mutants of *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **145**: 195-206.
- Cohen, H.J.**, Fridovich, I. and Rajagopalan, K.V. (1971): Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J Biol Chem* **246**: 374-382.
- Coughlan, M.P.**, Johnson, J.L., Rajagopalan, K.V. (1980): *J Biol Chem* **255**: 2694.
- Da Silva, J.R.R.**, Frausto and Williams, R.J.P. (1991): The biological chemistry of the elements. *Clarendon*, Oxford: pp 3-32
- De Renzo, E.C.**, *et al.* (1953): Identification of the xanthine oxidase factor as molybdenum. *Arch Biochem Biophys* **45**: 247-253.
- De Vries, S.E.**, Dirks, R., Mendel, R.R., Schaart, J.G., Feenstra, W.J. (1986): Biochemical characterization of nitrate reduktase deficient mutants of *Nicotiana tabacum*. *Plant Science*, **44**: 105-110.
- Deutscher, M.P.** (1990): Protein purification. In *Methods in Enzymology*. *Acad. Press*.
- Doyle, W.A.**, *et al.* (1996): Properties of xanthine dehydrogenase variants from *rosy* mutant strains of *Drosophila melanogaster* and their relevance to the enzymes structure and mechanim. *Eur J Biochem* **239**: 782-795.
- Enemark, J.H.**, Young, C.G. (1993): *Adv Inorg Chem* **40**: 1.

- Gabard, J., et al.** (1988): Genetic analysis of nitrate reductase-deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for six complementation groups among 70 classified molybdenum cofactor-deficient mutants. *Mol Gen Genet* **213**: 206-213.
- George, G.N., Prince, R.C., Kipke, C.A., Sunde, R.A., Enemark, J.H.** (1988): *Biochem J* **256**: 307.
- Gottesmann, S., Halpern, E., und Trisler, P.** (1981). *J. Bacteriol.* **148**: 265-273
- Gupta, U.C.** (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. Cambridge University Press.
- Hanahan, D** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557.
- Heath, R.L.** (1980): Initial events in injury to plants by air pollutants. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 395-431.
- Hightower, R.C., Meagher, R.B.** (1985): The molecular evolution of actin. *Genetics*, **114**: 315-332.
- Hille, R.**(1996): The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev* **96**: 2757-2816.
- Hinton, S.G., Sharp, P.M.** (1990): Biogenesis of Molybdenum cofactors. *CRC rev. Microbiol.*, **17**: 169-188
- Hoff, T., and Caboche, M.,** (1995): Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of Molybdenum cofactor biosynthesis by complementation of *E. coli* mutants. *J Biol Chem* **270**: 6100-6107
- Jaenicke, R., Rudolph, R.** (1990). Folding proteins. In Protein structure - a practical approach. (T.E. Creighton, ed.) *IRL Press, New York*.
- Johnson, J.L., Bastian, N.R., Rajagopalan, K.V.** (1990): Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter phaeoides forma specialis denitrificans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3190-3194.



- Johnson, J. L.,** Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. (1989): The Structure of a Molybdopterin Precursor. Characterization of a stable, oxidized derivative. *J. Biol. Chem.*, **264**: 13440-13447.
- Johnson, J. L.,** and Rajagopalan, K.V. (1980): Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthin oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J Biol Chem* **255**: 1783-1786.
- Johnson, J. L.,** and Rajagopalan, K.V. (1982): Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6856-6860.
- Johnson, M. E.,** and Rajagopalan, K.V. (1987a): *In vitro* system for molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* **169**: 110-116.
- Johnson, M. E.,** and Rajagopalan, K.V. (1987b): Involvement of *chlA*, *E*, *M*, and *N* Loci in *E. coli* molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* **169**: 117-125.
- Johnson, M.E.,** Hainline, B.E., Rajagopalan K.V. (1984): The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J. Biol. Chem.*, **259**: 5414-5422.
- Kamdar, P.,** Sheton, M.E., Finnerty; V. (1994): The *Drosophila* molybdenum cofactor gene *cinnamon* is homologous to three *Escherichia coli* cofactor proteins and to the rat protein Gephyrin. *Genetics*, **137**, 791-801.
- Ketchum, P.A., et al.** (1970): *In vitro* assembly of *Neurospora* assimilatory nitrate reductase from protein subunits of *Neurospora* mutant and the xanthine oxidizing or aldehyde oxidase systems of higher animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **66**: 1016-1023.
- Kleinhofs, A.,** Warner, R.L. (1990): Advances in nitrate assimilation. In *The Biochemistry of plants* (Miflin, B.J. and Lea, P.J., eds). San Diego: *Academic Press*, pp 89-120.
- Kramer, S.P.,** and Rajagopalan, K.V (1987): The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J Biol Chem* **262**: 16357-16363.

- Krüger, B.**, and Meyer, O., (1986): The pterin (bactopterin) of carbon monoxide dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydoflava*. *Eur J Biochem* **157**: 121-128.
- Kyte, J.**, Dollittle, R.F. (1982): A methode for diplaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132.
- Laemmli, K.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamy, M.T.**, Gutteridge, S., Bray, R.C. (1980): *Biochem J* **185**: 397.
- Leimkühler, S.**, *et al.*, (1998): Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar ti ist eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. *Mol Micobiol* **27**: 853-869.
- Lewin, B.** (1995): Genes V. *Oxford University Press*.
- Ludden, P.W.**, et al., (1993): Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In Stiefel EI, Coucouvanis D, Newton WE (eds) Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems. ACS symposium series 535. Amer Chem Soc, Washington DC, pp 196-215.
- Mahler, H.R.**, Mackler, B. and Green, D.E. (1954): Studies on metallo-flavoproteins. III. Aldehyd oxidase: a molybdoflavoprotein. *J. Biol Chem* **210**: 465-480.
- Mendel, R.R.** (1992): The plant molybdenum cofactor (MoCo) - its biochemical and molecular genetics. In: Plant Biotechnology and Development-Current Topics in Plant Molecular Biology; (ed.: P.M. Gresshoff), Vol. 1. *CRC Press, Boca Raton London*.
- Mendel, R.R.**, Marton, I., Müller, A.J.(1986): Comparative biochemical characterization of mutants at the nitrate reductase/molybdenum cofactor loci *cnxA*, *cnxB* and *cnxC* of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Science*, **43**: 125-129.
- Müller, A.J.**, Mendel, R.R. (1989): Biochemical and somatic cell genetics of nitrate reduction in *Nicotiana*. In Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation (eds.: J.L. Wray and J.R. Kinghorn). *Oxford University Press*.

- Nason, A., et al.** (1971): *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 3232-3236.
- National Academy of Sciences** (1983): Acid deposition atmospheric processes in Eastern North America. National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, DC.
- Nicholas, D.J.D.,** and Nason, A. (1954): Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* **207**: 353-361.
- Pateman, J.A.,** Cove, D.J., Rever, B.M. and Roberts, D.B. (1964): A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature* **201**: 58-60.
- Petering, D.H.** (1977): Sulfur dioxide: A view of its reactions with biomolecules. In „Biochemical effects of environmental pollution“ (S.D. Lee, ed.), pp. 293-306. Ann Arbor Books, Ann Arbor, MI.
- Pienkos, P.T.,** Shah, V.K., Brill, W. (1997): Molybdenum cofactors from molybdoenzymes and *in vitro* reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5468-5471.
- Pitterle, D.,** Rajagopalan K.V. (1993): *In vitro* Synthesis of Molybdopterin from Precursor Z Using Purified Converting Factor. *J.Biol. Chem.*, **268**: 13506-13509
- QIAGEN** (1992): The QIAexpressionist. The high level expression & protein purification system.
- Romão, M.J., et al.,** (1995): Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from *D. gigas*. *Science* **270**: 1170-1176.
- Rajagopalan, K.V.,** Johnson, J.L. (1992): Minireview: The Pterin Molybdenum Cofactor. *J. Biol. Chem.*, **267**: 1199-10202.

- Rohde, H.** (1978): Budget and turn-over times of atmospheric sulfur compounds. *Atmos Environ* **12**: 671-680.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F.**, Nickler, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**: 5463-5467.
- Schindelin, H.**, *et al.*, (1996): The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FDH. *Science* **272**: 1615-1619.
- Schledzewski, K.** (1993): Vergleichende Untersuchungen zu der Effizienz von Promotoren in pflanzlichen Zellkultur-Systemen von Mais (*Zea mays*), Gerste (*Hordeum vulgare*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*). *Diplomarbeit*, TU Braunschweig
- Shanmugam, K.T.**, Boxer, D.H., Cole, J.A., Chippaux, M., DeMoss, J.A., Giordano, G., Guest, J., Gunsalus, R.P., Lin E.C.C., Rajagopalan K.V., Stewart, V. (1992): Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mol. Micro.*, **6**: 3452.
- Stallmeyer, B.** (1994): Isolierung und Charakterisierung einer cDNA aus *Arabidopsis thaliana*, die die *E.coli* Molybdäncofaktor-Mutante *mogA* funktionell komplementiert. *Diplomarbeit*. TU Braunschweig.
- Stallmeyer, B.**, Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H., Mendel, R.R. (1995): Molybdenum cofactor biosynthesis: The *Arabidopsis* cDNA *moco1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein and the insect protein Cinnamon and three *E. coli* proteins. *Plant J.*
- Stewart, V.**, Mac Gregor, C.H. (1982): Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: Involvement of *chlC*, *chlE* and *chlG* loci. *J. Bacteriol.*, **151**: 788-799.
- Stöckhardt, J.A.** (1871): Untersuchungen über die schädliche Einwirkung des Hütten- und Steinkohlerauches auf das Wachstum der Pflanzen, insbesondere der Fichte und Tanne. *Tharandter Forstl. Jahrb.* **21**: 218-254.

- Takahama, U., et al.** (1992): Effects of the air pollutant SO<sub>2</sub> on leaves: inhibition of sulfite oxidation in the apoplast by ascorbate and of apoplastic peroxidase by sulfite. *Plant Physiol* **100**: 261-266.
- Tanaka, K.,** Otsubo, T., and Kondo, N. (1982): Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin-cycle SH enzymes in SO<sub>2</sub>-fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol* **23** (6): 1009-1018.
- Villarejo, M.,** Zamenhof, P.J. (1972): Constriction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of β-galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriology*, 171-178
- Voet, D.,** Voet, J.G. (1992): Biochemie. VCH VerlagsgesellschaftmbH. Weinheim. 1. Auflage.
- Warner, R.L.,** Kleinhofs, A. (1992): Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiol. Plant.*, **85**: 245-252.
- Weiner, O.H.,** Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher, M., Noegel, A.A. (1993): The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.*, **123**: 23-34
- Westerfeld, W.W.,** Richert, D.A. (1949): A new dietary factor related to xanthine oxidase. *Science* **109**: 68.
- Wuebbens, M.,** Rajagopalan K.V. (1993): Structural Characterization of a Molybdopterin Precursor. *Journal of Biol. Chem.*, **268**: 13493-13498.
- Würfel, M.,** Häberlein, I., and Follmann, H. (1990): Inactivation of thioredoxin by sulfite ions. *FEBS Lett* **268**: 146-148.
- Ziegler, I.** (1974): Action of sulfite on plant malate dehydrogenase. *Phytochemistry* **13**: 2411-2416.
- Ziegler, I., et al.,** (1976): Action of sulfite on the substrate kinetics of chloroplastic NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Phytochemistry* **15**: 1627-1632.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. dr. R.R. Mendel. Durch Ihn wurde mein wissenschaftliches Interesse geweckt und stets unterstützt. Er räumte mir die Freiheiten ein, eigene Ziele zu verwirklichen und auch andere Forschungseinrichtungen kennenzulernen. Ich danke Ihm ebenfalls für das entgegengebrachte Vertrauen, als Vertreter seiner Arbeitsgruppe die erzielten Ergebnisse meines wissenschaftlichen Strebens auch in anderem Umfeld präsentieren zu können.

Herrn Prof. Dr. M. Wettern danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und die Teilnahme in der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Cerff danke ich für die Bereitschaft der Prüfung als Mitglied der Prüfungskommission beizuwohnen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Russ Hille, der durch seine ideelle und materielle Unterstützung den achtwöchigen Aufenthalt in der wunderschönen Stadt Columbus erst möglich gemacht hat. Ihm und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe schulde ich Dank.

Den gesamten Mitgliedern der AG Mendel möchte ich Dank sagen, für ein sehr gutes Arbeitsklima in dem auch einmal Platz für einen schlechteren Tag war. Besonders erwähnen möchte ich Gerrit Gutzke und Jochen Kuper, denen ich mit nervigen Fragen und Wünschen oftmals zusätzliche Arbeit bereitet habe. Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Jutta Schulze für das stetige Freihalten von möglichen „Bremsen“-Jobs, die mir ein Studieren finanziell sehr erleichtert haben.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern und meiner lieben Frau Ilona für die moralische und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums danken. Ohne diese, mir zuteil werdende, unendliche Unterstützung und Motivation hätte diese Arbeit nicht werden können, was sie geworden ist.

Nicht zuletzt danke ich mir selbst, für die Hartnäckigkeit, die mich trotz manchen „Steins auf dem Weg“ immer vorangetrieben hat, meine Ziele zu verfolgen.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name : Thomas Eilers  
Geburtsdatum : 05. Februar 1968  
Geburtsort : Braunschweig  
Nationalität : deutsch  
Familienstand : verheiratet mit Ilona Eilers; zwei Kinder, Justin und Stella Eilers  
Zivildienst : 1990 – 1991 NLK Königslutter

### Schul Ausbildung

1974 – 1978 : Grundschule Lehdorf/Braunschweig  
1978 – 1980 : Orientierungsstufe Lehdorf/Braunschweig  
1980 – 1984 : Realschule Maschstraße  
1984 – 1987 : Ausbildung zum Bauzeichner  
1987 – 1990 : BS-Kolleg Braunschweig, Abschluß: Abitur

### Studium

1991 – 1997 : Studium der Biologie an der TU Braunschweig  
1993 : Diplomvorprüfung Sept. 1993  
1997 : Diplomarbeit am Botanischen Institut der TU Braunschweig  
Thema: „Nachweis von Wechselwirkungen des affinitäts-  
chromatographisch aufgereinigten und in *E. coli*  
überexprimierten Cnx1-Proteins, sowie des Cnx1-homologen  
Proteins Gephyrin mit dem Cytoskelett“  
Diplom: Juli 1997, Note: sehr gut

### Promotion

August 1997 : Promotion am Botanischen Institut der TU Braunschweig  
Thema: „Identifizierung, Klonierung und biochemische  
Charakterisierung der pflanzlichen Sulfitoxidase aus *A. thaliana*“  
Juni/Juli 2000 : Forschungsaufenthalt am Department of Molecular and  
Biochemistry, The Ohio State University bei Russ Hille

Braunschweig, den 12.07.01